

**Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. med. J. Schölmerich
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**Die unterschiedlichen Migrationspotentiale von Myofibroblasten aus entzündeter,
fistulierter und stenosierter Darmschleimhaut von Morbus Crohn Patienten gehen mit
einer unterschiedlichen Expression der Focal Adhesion Kinase (FAK) einher**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dr. med. Johannes Meier

2009

**Aus dem Lehrstuhl
für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. med. J. Schölmerich**
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Die unterschiedlichen Migrationspotentiale von Myofibroblasten aus entzündeter,
fistulierter und stenosierter Darmschleimhaut von Morbus Crohn Patienten gehen mit
einer unterschiedlichen Expression der Focal Adhesion Kinase (FAK) einher**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dr. med. Johannes Meier

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gerhard Rogler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2010

Für meine Familie

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CLPF	<i>Colonic lamina propria fibroblast</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
Hz	Hertz
M	Molar
mA	Milli-Ampere
MC	Morbus Crohn
min	Minute(n)
mJ	Milli-Joule
mM	Milli-Molar
PDGF	<i>Plateled derived growth factor</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
P/S	Penicillin/Streptomycin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

sec	Sekunden
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β 1	<i>transforming growth factor-β1</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	1
1.2	Aufbau der Darmwand	4
1.3	Mögliche Komplikationen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	5
1.3.1	Gestörte Wundheilung und Bildung von Fisteln	5
1.3.2	Überschießende Wundheilung und Entstehung von Stenosen	6
1.4	Migration von Fibroblasten und Myofibroblasten	8
1.5	Morphologie sich bewegender Fibroblasten: Mikrospikes und Lamellipodien	10
1.6	Die Migration von Zellen ist aktinabhängig	12
1.7	Wachstumsfaktoren, Zytokine und Fibronectin und ihre Bedeutung für die Zellmigration	13
1.7.1	Wachstumsfaktoren	14
1.7.2	Entzündungsmediatoren: TNF und IFN γ	15
1.7.3	Die Extrazellulärmatrix-Komponente Fibronectin	17
1.8	Mechanismen der Migration mesenchymaler Zellen und Rolle der <i>Focal Adhesion Kinase</i> (FAK)	19
1.9	Arbeitsziele	21
2	Materialien und Geräte	24

2.1	Chemikalien und Kits	24
2.1.1	Zellkultur	24
2.1.2	Immunhistochemie	24
2.1.3	Migrations-Assays	25
2.1.3.1	Zytokine	25
2.1.3.2	Extrazellulärmatrrixprotein	25
2.1.4	Western Blot und Vorarbeiten	25
2.1.4.1	Lysepuffer	25
2.1.4.2	Proteinbestimmung	26
2.1.4.3	Größenstandarts (Marker)	26
2.1.4.4	Gradientengele	26
2.1.4.5	Running- und Transferpuffer	26
2.1.4.6	Waschpuffer	26
2.1.4.7	Detektion	26
2.1.4.8	Antikörper	26
2.1.4.9	Positiv-Kontrolle	27
2.1.4.10	Stripping	27
2.2	Sonstige Verbrauchsmaterialien	27
2.3	Geräte	28
2.3.1	Laboraausstattung	28
2.3.2	Lasertechnik	29
3	Methoden	30
3.1	Isolation und Kultur von primären humanen intestinalen Myofibroblasten	30

3.2	Herstellung der dreidimensionalen Myofibroblastenmatrix	33
3.2.1	Hintergrund	33
3.2.2	Vorbereitungen	34
3.2.3	Matrix	34
3.3	Zelllyse mittels Erbium:YAG-Laser	34
3.3.1	Hintergrund	34
3.3.2	Erzeugung eines kreisrunden Defektes im Zellrasen bei erhaltener ECM	35
3.3.2.1	Ablauf	37
3.3.2.2	Dokumentation	37
3.4	Vorarbeiten für den Nachweis der Focal Adhesion Kinase (FAK) auf Proteinebene	38
3.4.1	Verwundung eines konfluenten <i>Monolayers</i> und Induktion der Migration von CD-CLPF	38
3.4.2	Lyse der Fibroblasten	38
3.4.3	Proteinbestimmung mittels <i>Bicinchoninic acid (BCA)-Test</i>	39
3.5	Nachweis von <i>Focal Adhesion Kinase</i> (FAK) mittels Gelelektrophorese und <i>Western Blotting</i>	40
3.5.1	Elektrophoretische Eigenschaften von Proteinen und Struktur von Polyacrylamidgelen	40
3.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.5.3	Vorbehandlung der Proteinproben	43
3.5.4	Beladen des Gels und Elektrophorese	43
3.5.5	<i>Western-Blotting</i> : Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran	44
3.5.6	Ponceau S-Färbung und <i>Immunoblotting</i>	46
3.5.7	Proteindetektion durch Chemielumineszenz	46
3.5.7.1	Allgemeines	46

3.5.7.2	Beschreibung der Technik Aussaat der Zellen auf 2-well-chamber-slides	47
3.5.8	<i>Stripping</i>	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Migrationsversuche mit einer von Fibroblasten induzierten dreidimensionalen Matrix	49
4.1.1	Quantitative Auswertung	51
4.1.2	Qualitative Beobachtung und Beschreibung des Migrationsverhaltens	55
4.1.2.1	Beobachtungen während und nach der Migration der Fibroblasten aus entzündeter Mucosa (CD-CLPF)	55
4.1.2.2	Beobachtungen während und nach der Migration der Stenosefibroblasten	56
4.1.2.3	Beobachtungen während und nach der Migration von Fibroblasten aus fistulierten Darmarealen	56
4.2	Die unterschiedlichen Migrationspotentiale von Myofibroblasten aus entzündeter, fistulierter und stenosierter Darmschleimhaut gehen mit einer unterschiedlichen Expression der Focal Adhesion Kinase (FAK) einher.	61
4.2.1	Regulation der FAK in Myofibroblasten aus entzündeten, fistulierten und stenosierte Darmarealen nach Verwundung	61
4.2.2	Die Expression von FAK in Myofibroblasten aus entzündeten, fistulierten und stenosierte Darmarealen nach 3 Tagen Inkubation mit IFN- γ und TNF und anschließender 7-tägiger Normalkultur	63
5	Diskussion	66
5.1	Das Migrationsverhalten unterscheidet sich bei Myofibroblasten aus stenosierte, fistulierten und entzündeten Darmarealen von Patienten mit Morbus Crohn im dreidimensionalen Migrationsmodell.	66
5.2	Die Fokale Adhesion Kinase (FAK) als wesentlicher Faktor der Migration von Myofibroblasten	70

6	Zusammenfassung	78
7	Literaturverzeichnis	80
8	Danksagung	105

1 Einleitung

1.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, deren Ätiologie und Pathogenese bislang nicht geklärt sind. Epidemiologischen Studien zufolge liegt die jährliche Neuerkrankungsrate für Morbus Crohn bei 2-4 und für Colitis ulcerosa bei 3-9 Personen pro 100.000 Einwohner. In Deutschland schätzt man die Zahl der Erkrankungen auf über 300.000. Bei Erstdiagnose sind die Patienten meist zwischen 20 und 30 Jahre alt.

Im Moment werden die ätiopathogenetischen Faktoren, die zur Entstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung führen, wieder verstärkt diskutiert. Als bewiesen gilt, dass ein polygenetischer Hintergrund vorliegen muss, der zu einer familiären Häufung bei Morbus Crohn führen kann. Dennoch treten 80% der Fälle sporadisch auf. Auch lieferten familiäre Untersuchungen und Konkordanzstudien an Zwillingen Hinweise auf das Vorhandensein einer genetischen Prädisposition für Morbus Crohn. Monozygote Zwillinge haben bei Erkrankung ihres Geschwisters im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung ein bis zu 35-fach erhöhtes Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken (Neurath MF et al., 2000; Binder V et al., 1996). In den späten 1990er Jahren gelang es durch Kopplungsanalysen, Risikoregionen auf den Chromosomen 12 und 16 sowie weitere potentielle Regionen auf den Chromosomen 3, 7 und 11 zu identifizieren (Schreiber S et al., 1998). Nach der Identifizierung von NOD2/CARD15-Mutationen auf Chromosom 16 (Hugot JP et al., 2001; Ogura Y et al., 2001) vor einigen Jahren sind mittlerweile mehr als 30 Gene identifiziert worden, die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung stehen (Cooney R. et al., 2009).

Umwelteinflüsse wie Rauchen, Ernährungsgewohnheiten und Infektionen scheinen ebenfalls eine Rolle bei der Genese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu spielen (Neurath MF et al., 2000; Klein I et al., 1998). Rauchen ist ein wichtiger Risikofaktor für einen aggressiven Krankheitsverlauf und das postoperative Rezidiv bei Morbus Crohn. Interessanterweise hatte dagegen in mehreren Studien bei der Colitis ulcerosa das Rauchen eine protektive Wirkung auf die Krankheitsmanifestation (Neurath MF et al., 2000). Wahrscheinlich müssen genetische Faktoren mit epigenetischen Komponenten (Umwelt) zusammentreffen, damit sich chronisch-entzündliche Darmerkrankungen manifestieren.

Klinisch haben Morbus Crohn und Colitis ulcerosa viele Gemeinsamkeiten. Typisch für den Morbus Crohn sind abdominelle Schmerzen, während bei der Colitis ulcerosa vor allem Diarrhöen mit bis zu fünfzehn Stuhlgängen am Tag im Vordergrund stehen. Außerdem führen beide Erkrankungen häufig zu Gewichtsabnahme und Mangelernährung. Verlauf, Ausdehnung und Schweregrad der beiden Erkrankungen sind sehr variabel und nicht vorhersehbar. In der Mehrzahl der Fälle werden mehr oder weniger lange Remissionsphasen von akuten Schüben unterbrochen. Bei etwa 20-30% der Patienten findet sich ein chronisch aktiver Verlauf (Adler G , 1996).

M. Crohn:

Der Morbus Crohn ist eine entzündliche Erkrankung aller Schichten der Darmwand (transmural). Er ist charakterisiert durch einen diskontinuierlichen Befall der Schleimhaut (Abbildung 1-1). Sämtliche Abschnitte des Magen-Darm-Traktes vom Mund bis zum Enddarm können betroffen sein.

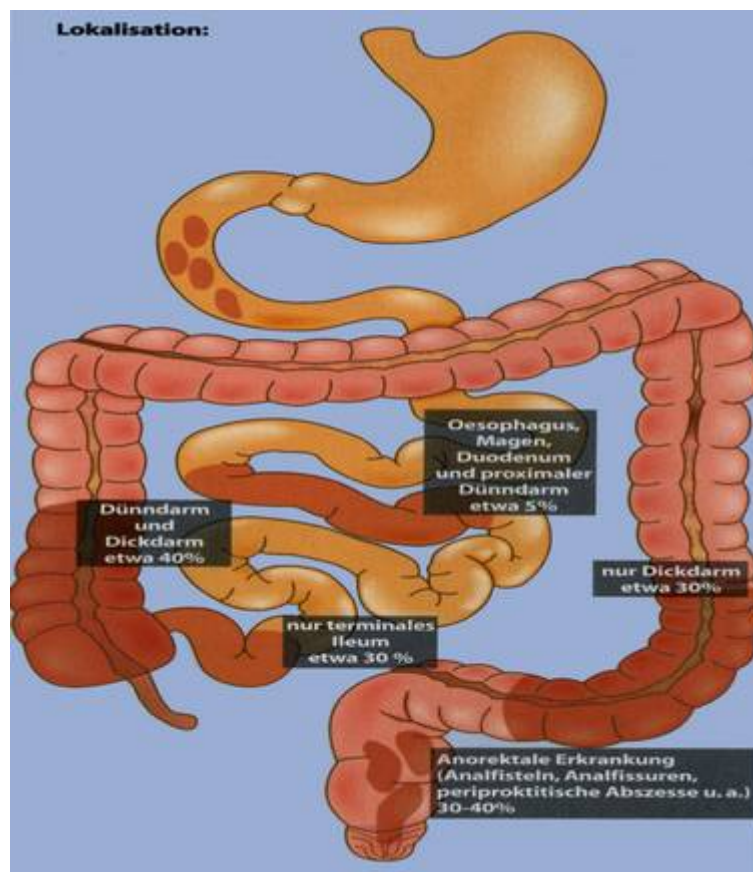


Abbildung 1-1 Morbus Crohn-Lokalisation im Gastrointestinaltrakt (in Anlehnung an M. Reinshagen, „Praxis der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen - Eine Fibel für den Hausarzt“, 2001, S.12)

Beim Morbus Crohn handelt es sich um ein komplexes Krankheitsbild, das durch verschiedene intestinale und extraintestinale Manifestationen gekennzeichnet ist. Eine medikamentöse und chirurgische Heilung der Erkrankung gelingt bisher nicht. Die Therapie zielt vielmehr unspezifisch auf eine Reduktion des Entzündungsgeschehens ab (Adler G, 1996).

Colitis ulcerosa:

Die Colitis ulcerosa ist eine Erkrankung, die auf die Colonmucosa beschränkt bleibt. Sie beginnt im Rectum, breitet sich kontinuierlich nach proximal aus und befällt in etwa 18% der Fälle das gesamte Colon (Abbildung 1-2). Die Erkrankung ist nur durch eine totale Colektomie, d.h. durch eine operative Entfernung des gesamten Dickdarms, heilbar (Adler G, 1996).

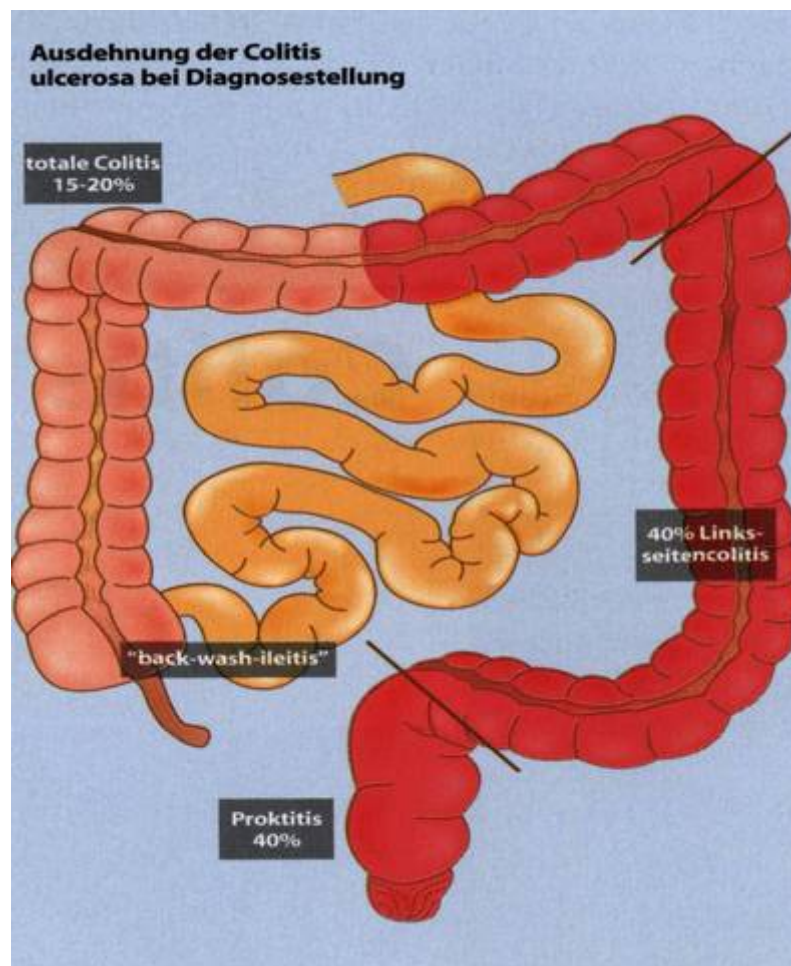


Abbildung 1-2 Colitis ulcerosa-Lokalisation im Gastrointestinaltrakt (in Anlehnung an M. Reinshagen, „Praxis der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen - Eine Fibel für den Hausarzt“, 2001, S.12)

Eine spezifische medikamentös-kurative Therapie ist für beide Erkrankungen nicht bekannt. Ziel der therapeutischen Maßnahmen ist bis heute die symptomatische Behandlung der akuten Entzündung und die Verlängerung der Remissionsphase. Prognose und Verlauf der Erkrankungen können derzeit medikamentös nicht wesentlich beeinflusst werden (Schölmerich J, 2004).

1.2 Aufbau der Darmwand

Zum besseren Verständnis der folgenden Abschnitte soll hier kurz auf den Aufbau der Darmwand eingegangen werden (Abbildung 1-3).

Die Mucosa wird zum Darmlumen hin durch die Epithelschicht begrenzt, die auf einer Basalmembran fixiert ist. Ihren größten Teil stellt die Lamina propria, die aus Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Kapillaren und extrazellulärer Matrix besteht, dar. Die Mucosa wird durch die Submucosa von der Muscularis mucosae getrennt. Diese ist eine etwa fünf Zelllagen dicke Schicht aus glatten Muskelzellen, die der Darmmotilität dient.

Die Submucosa ist ein loses Maschenwerk von dünnen Kollagenfibrillen, das die Mucosa mit der Muscularis propria verbindet. Außerdem führt sie Blutgefäße und Lymphbahnen zur Muscularis.

Die Muscularis propria besteht aus dicht gepackten, glatten Muskelzellen, umgeben von dünnen Kollagenfibrillen. Diese Fibrillen verbinden sich zu Kollagenfasern, die intramuskuläre Septen bilden.

Das vorherrschende Bindegewebsprotein im Darm ist Kollagen, welches von den mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen, produziert wird. Analysen des Kollagentyps im intestinalen Muskel zeigen, dass die Typen I und III überwiegen (Graham MF et al., 1995).

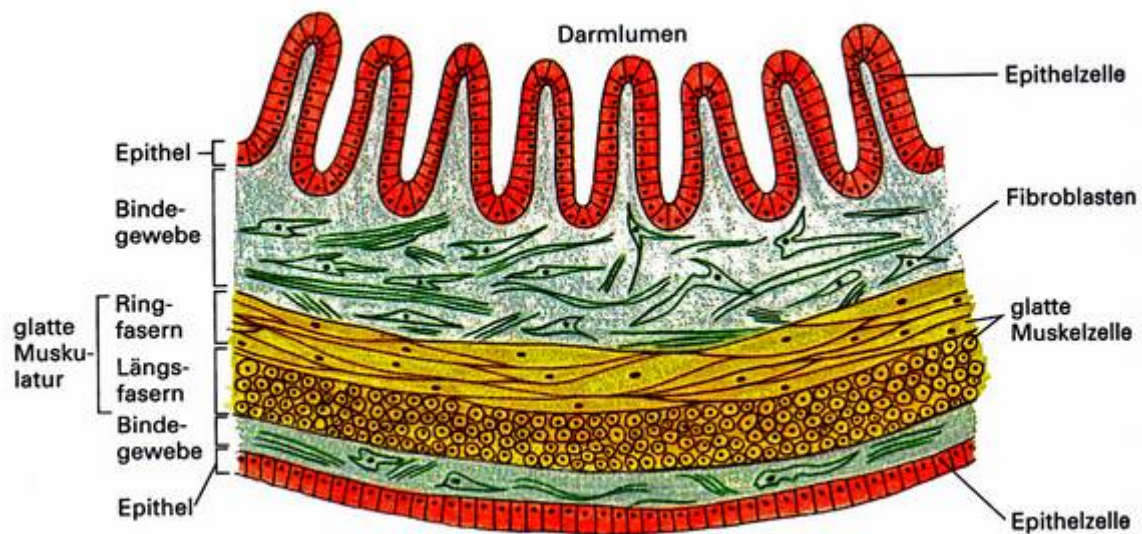
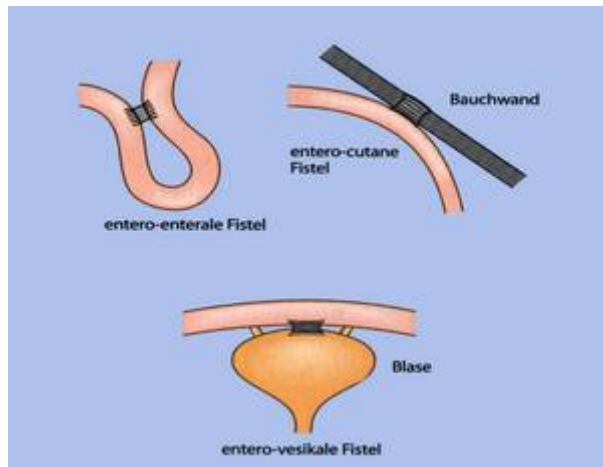


Abbildung 1-3 Aufbau der Darmwand. (in Anlehnung an Alberts B, „Molekularbiologie der Zelle“, 2004, 4. Auflage, S. 1238)

1.3 Mögliche Komplikationen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

1.3.1 Gestörte Wundheilung und Bildung von Fisteln

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind Erkrankungen, die oft mit Ulzerationen und großen Gewebedefekten einhergehen (Lorenz R et al., 1996). Häufig ist bei diesen Erkrankungen die Wundheilung gestört. Gerade nach einer Entfernung des Rectums (Hartz RS et al., 1980; McGarity WC et al., 1976; McLeod R et al., 1983; Oakley JR et al., 1985; Tompkins RG et al., 1985; Waits JO et al., 1982) oder nach Entfernung des Colons und des Rectums (Hartz RS et al., 1980) stellt eine gestörte Heilung der Anastomose der Resektionsränder eine häufige Komplikation dar. Eine weitere Komplikation ist die Bildung von Fisteln, die ebenso schlecht abheilen (Abbildung 1-4). Eine anti-TNF-Therapie zur Fistelbehandlung zeigt bei über 50% der Betroffenen keinen Erfolg (Accent II-Studie, 2004), so dass oft nur noch die operative Fistelentfernung oder intermittierend eine Anus-*praeter*-Anlage bleibt.



A)

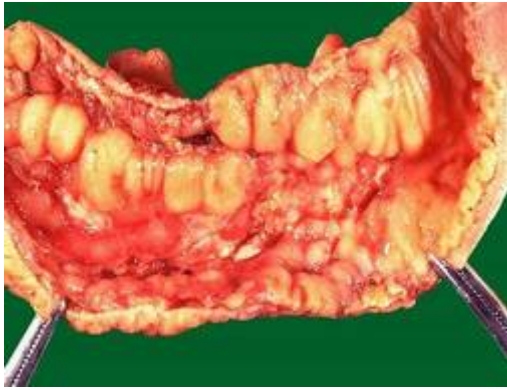
B)

Abbildung 1-4 A) zeigt mögliche Fistellokalisierungen bei Morbus Crohn, „Praxis der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen - Eine Fibel für den Hausarzt“, 2001, S.17, M. Reinshagen; B) zeigt eine endoskopische Aufnahme einer Fistel bei Morbus Crohn (von Prof. Dr. Dr. G. Rogler zur Verfügung gestellt).

Diese langwierigen Heilungsprozesse stellen für die Patienten sowohl psychisch als auch physisch eine enorme Belastung dar. Deshalb sollten neue Therapieansätze zur medikamentösen Abheilung von Fisteln und zur Verbesserung der postoperativen Wundheilung bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erprobt werden. Dazu müssen allerdings die Mechanismen, die bei der Wundheilung eine Rolle spielen untersucht und identifiziert werden.

1.3.2 Überschießende Wundheilung und Entstehung von Stenosen

Eine bei Morbus Crohn häufig auftretende Komplikation ist die Entstehung von Stenosen (Abbildung 1-5). Dieses Phänomen ist bei der Colitis ulcerosa nur selten zu beobachten, wohingegen bei Morbus Crohn bis zu 50% der Patienten betroffen sind. Meist ist während des Krankheitsverlaufes trotz maximaler medikamentöser Therapie und guter ärztlicher Betreuung eine Operation unumgänglich.



(A)



(B)

Abbildung 1-5 (A) zeigt ein Resektat eines stenosierten Darmabschnittes bei Morbus Crohn; (B) zeigt eine endoskopische Aufnahme einer Stenose bei Morbus Crohn (von Prof. Dr. Dr. G. Rogler zur Verfügung gestellt).

Gründe für eine Stenosenentstehung sind bisher weitgehend unbekannt. Auch ist unklar, weshalb die eine Patientengruppe rezidivierende Stenosen aufweist, während eine andere eher Fisteln und Abszesse entwickelt. M. F. Graham vermutet als Ursache für die Entstehung von Stenosen eine überschießende Wundheilung des zerstörten Gewebes in den verschiedenen Wandschichten des Darmrohrs wie der Mucosa, Submucosa und Muscularis propria (Graham MF et al., 1995). Die Untersuchungen hierzu liefern aber noch keine schlüssigen Konzepte.

Einige Faktoren scheinen die Stenosenbildung zu begünstigen: So spielt die Stärke der Entzündung genauso wie die Chronizität derselben eine wichtige Rolle. Auch für die mesenchymale Zellantwort muss wohl eine Verletzung der Submucosa vorausgehen.

Beim Morbus Crohn ist diese Submucosa typischerweise stark entzündet und dient den mesenchymalen Zellen nach ihrer Migration als Ort der Proliferation. Außerdem produzieren die mesenchymalen Zellen dort vermehrt Kollagen um Gewebedefekte zu schließen, wodurch es zu einer Kollagenanhäufung in der Submucosa kommen kann (Graham MF et al., 1995).

Die Mechanismen der Migration von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten, Myofibroblasten oder glatten Muskelzellen und die Induktion einer Migration aus der Muscularis mucosae in die Submucosa, z.T. aber auch in die Mucosa sind bisher weitgehend unverstanden. Der kritische Punkt der intestinalen Wundheilung ist, dass diese in einem Hohlorgan stattfindet; dies wird vom Wundheilungsprozess bei der Defektdeckung nicht berücksichtigt. Bei einer chronischen Entzündung kann es zu einer überschießenden Wundheilung kommen, die zu einer Veränderung der Darmwandarchitektur führen kann. Dies wiederum hat einen

Verlust der Funktion und der Durchgängigkeit des Lumens zur Folge. Es bilden sich Strikturen und Stenosen.

Histologische Untersuchungen zeigen, dass beim stenosierten Darm die Muskelschichten massiv verdickt sind. Dies lässt auf eine Zellproliferation und Hypertrophie in gleicher Weise schließen; zusätzlich findet man durch die verstärkte Kollageneinlagerung eine verdickte Submucosa (Graham MF et al., 1995).

Im gesunden Darm ermöglichen die dünnen Kollagenfibrillen der Submucosa eine Bewegung der Submucosa über der Muscularis. Im entzündeten Darm dagegen kann diese Beweglichkeit verloren gehen und die Mucosa haftet an der Muscularis propria an (Graham MF et al., 1995). Diese Mobilitätseinschränkung und die Verdickung aller Schichten der intestinalen Wand tragen mit zur Stenosenentstehung bei. Dies wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt.

Theoretisch lässt sich dieser Beweglichkeitsverlust zumindest teilweise auf die Anhäufung und Vernetzung des submucosalen Kollagens zurückführen. Es ist möglich, dass diese abnorme submucosale Matrix von phänotypisch veränderten glatten Muskelzellen verursacht wird (Graham MF et al., 1995).

Repariertes Gewebe erfährt eine Kontraktion, wenn mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, Myofibroblasten und Muskelzellen in den Heilungsprozess involviert sind. Dieses Phänomen ist auch bei der Heilung von Hautverbrennungen zu beobachten. Begründen lässt sich dies damit, dass glatte Muskelzellen und Fibroblasten dazu neigen, die fremde Matrix, auf der sie wachsen, zu kontrahieren. Ein ähnlicher Vorgang lässt sich im vernarbenden Darm beobachten; es kommt zu einer Kontraktion von Matrix und mesenchymalen Zellen und schließlich zu einer Stenose (Graham MF et al., 1995).

1.4 Migration von Fibroblasten und Myofibroblasten

Im menschlichen Körper sind Myofibroblasten in allen Organen und Geweben vorhanden. Fibroblasten und Myofibroblasten gehören zur Familie der Bindegewebszellen und spielen deswegen für das architektonische Gerüst des Körpers eine wichtige Rolle. Sie sind in fast jedem Organ und Gewebe wichtige Strukturgeber und üben stützende Funktion aus. Außerdem spielen Migration und Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten, aber

auch deren Produkte von Extrazellulärmatrix (ECM), eine herausragende Rolle bei der Wundheilung (Dale PD et al., 1997).

Das Einwandern von mesenchymalen Zellen aus umliegendem, unverletztem Gewebe in die Wunde ist ein essentieller Schritt bei der Wundheilung (Jones MK et al. 1999, Sartor RB et al. 1995, Rieder F et al. 2007). Die frühe Phase der Wundheilung ist durch intensive Abbauprodukte zur Entfernung des geschädigten Bindegewebes charakterisiert. Diese Abbauprodukte induzieren unter anderem die Einwanderung von Fibroblasten in das Wundgebiet. Die chemotaktisch wirkenden proteolytischen Fragmente der Matrixproteine haben einen wichtigen Anteil an der Modulation der Fibroblastenfunktion. Fibroblasten, die in das Granulationsgewebe einwandern, stammen von ruhenden, möglicherweise undifferenzierten Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe ab.

Aktivierte Fibroblasten verändern sich während ihrer Wanderung in die Wunde phänotypisch. Diese gerichtete Wanderung der Fibroblasten entlang eines chemotaktischen Gradienten ist eng mit einer zyklischen Anheftung und Ablösung der Adhäsionsmoleküle von den Proteinen der extrazellulären Matrix verbunden (Goris RJH et al., 1997). Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte nehmen in allen Phasen der Wundheilung eine zentrale Stellung ein. Diese Kommunikationsprozesse werden u.a. über Adhäsionsmoleküle vermittelt. Die Expression der Adhäsionsmoleküle wird einerseits durch ihre Liganden und andererseits durch ein suppressiv oder stimulierend wirkendes Zytokinmilieu reguliert. Adhäsionsmoleküle übertragen auch Signale in das Zellinnere, was eine Kommunikation mit dem Zellkern ermöglicht und häufig mit einer Aktivierung oder Deaktivierung der entsprechenden Zellen verbunden ist (Goris RJH et al., 1997). Alle am Prozess der Wundheilung beteiligten Zelltypen exprimieren ein charakteristisches Muster an Adhäsionsmolekülen. Wahrscheinlich kommt es in der Frühphase der Wundheilung durch die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche zusätzlich zu einer Induktion von Wanderungsprozessen. Dies bedeutet für die Wundheilungsphasen, dass Fibroblasten ihre maximale Aktivität während der frühen Wundheilungsphase entfalten, wenn sie in das Granulationsgewebe eindringen sollen. Im Granulationsgewebe teilen sich die Fibroblasten sehr schnell um anschließend das verletzte Gewebe durch maximale Extrazellulärmatrix-Proteinsynthese zu rekonstruieren. Adhäsionsmoleküle sind auch an Vorgängen wie Matrixsynthese oder Wundkontraktion beteiligt (Goris RJH et al., 1997). Bei schweren Fällen eines Gewebeschadens oder gastrointestinalen Mukosadefekts im speziellen wandern Myofibroblasten in den Defekt ein und produzieren eine Extrazelluläre Matrix (ECM) um die Regeneration möglichst schnell zu vervollständigen (Thampatty BP et al. 2006, Peters T et al. 2005). Dieser physiologische

Prozess ist im entzündlichen Milieu einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung gestört, was in der Bildung von Fisteln oder Strikturen resultiert (Leeb S et al. 2003). Eine Verzögerung der Wundregeneration führt zu einer Störung der natürlichen Barrierefunktion der Darmwand was zu einer bakteriellen Translokation vom Darmlumen in die Mukosawand führt (Cho JH et al. 2003). Die lokalisierte Expression von Integrinen und Matrix-Metalloproteinasen scheint eine wichtige Voraussetzung für die Migration von Fibroblasten zu sein. In Hautfibroblasten induzieren Tumor Nekrose Faktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) und Interferon γ (IFN γ) die Hochregulierung von $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha 1\beta 1$ -Integrinen (Gailit J et al., 1997). Die lokale proteolytische Aktivität der Metalloproteinasen (MMP) baut Matrixproteine ab und führt damit zur Ablösung der wandernden Fibroblasten von der Matrix. Ob eine funktionelle Vielfalt dieser Zellen vorliegt oder ob Fibroblastensubpopulationen existieren, ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine spezifische Integrin-Ligand-Interaktion induziert drastische Veränderungen im Cytoskelett von Fibroblasten; es entstehen Aktinbündel entlang der Zelllängsachse und die Zellform verändert sich. In verschiedenen Publikationen werden diese Zellen als Myofibroblasten bezeichnet. Man schreibt ihnen die oben erwähnte Fähigkeit zu, Wunden zu kontrahieren (Goris RJH et al., 1997) wobei Fibroblasten aus fibrotischen Arealen im Vergleich bei Mucopolysaccharidosepatienten eine -durch PDGF-getriggerte- erhöhte Migrationsleistung erzielen (Suganuma H et al. 1995). Pontz and Albin konnten ausserdem zeigen, dass die Reaktion auf chemotaktische Reize deutlich reduziert war (Pontz BF et al. 1984).

1.5 Morphologie sich bewegender Fibroblasten: Mikrospikes und Lamellipodien

Der Leitsaum eines kriechenden Fibroblasten streckt in regelmäßigen Abständen dünne, flächige Fortsätze aus, so genannte Lamellipodien, die ein dichtes Geflecht aus Aktinfilamenten enthalten. Viele Zellen bilden auch Mikrospikes aus; dies sind dünne, steife Auswüchse mit einem Durchmesser von ca. $0,1\mu\text{m}$ und einer Länge von $5\text{-}10\mu\text{m}$, in deren Innerem lockere Bündel aus etwa 20 Aktinfilamenten liegen.

Aktinfilamente erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Lamellipodien stärker geordnet als in anderen Bereichen der Zellrinde. Das Lamellipodium verhält sich als

Struktureinheit: wenn es sich an der Unterlage nicht festheften kann, klappt es meistens schnell als Kräuselung über die Zelle nach hinten (Abbildung 1-6, Alberts B et al., 2004).

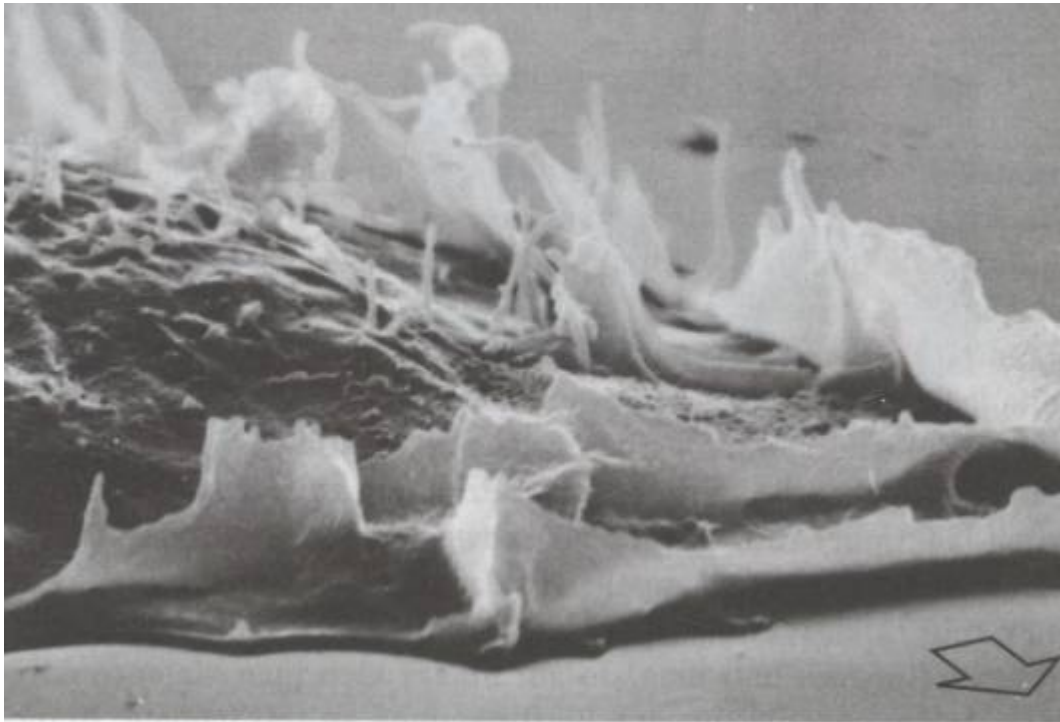


Abbildung 1-6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines humanen Fibroblasten, der sich in Pfeilrichtung fortbewegt. Während der Vorwärtsbewegung der Zelle gleiten Lamellipodien und Mikropikes, die nicht an der Kulturschale festhaften, über die Oberseite der Zelle nach hinten. Diese Bewegung bezeichnet man als „Kräuselung“ (In Anlehnung an Alberts B. et al., „Molekularbiologie der Zelle“, 2004, 4. Auflage, S. 1132).

Lamellipodien und Mikropikes bilden sich sehr schnell und verschwinden ebenso schnell wieder. Sie entstehen wahrscheinlich durch örtlich begrenzte Polymerisation von Aktin an der Plasmamembran. Bei diesem Vorgang kann sich die Plasmamembran schnell nach außen wölben ohne zu reißen.

1.6 Die Migration von Zellen ist aktinabhängig

Die Bewegung von Zellen ist ein Phänomen, das sich auf molekularer Ebene schwer erklären lässt, da sich verschiedene Teile der Zelle gleichzeitig verändern und es kein erkennbares Bewegungsorganell gibt, das beispielsweise einer Flagelle bei Einzellern entspräche.

Die Wanderung einer Zelle beruht darauf, dass Aktin viele Umwandlungen durchläuft, während sich die Zelle fortbewegt. Das Aktin lagert sich unter anderem zu Lamellipodien und Mikrospiques zusammen, es verbindet sich mit Fokalkontakten oder bildet Stressfasern. Stark vereinfacht kann man die Zellbewegung in drei Einzelvorgänge unterteilen (Abbildung 1-7):

- **Ausstülpung:** Lamellipodien und Mikrospiques werden aus der Vorderseite der Zelle nach vorne über das Substrat herausgestreckt. Angetrieben wird die Ausstülpung wahrscheinlich durch die Polymerisation von Aktin am Leitsaum. Sicher bewiesen ist diese Hypothese jedoch noch nicht.
- **Anheftung:** Gemeint ist damit die Verbindung zwischen aktinhaltiger Zellrinde und Unterlage. Es handelt sich dabei um spezialisierte Anheftungsstrukturen, die in Gewebekulturfibroblasten mit den Enden der Stressfasern assoziiert sind. Transmembranrezeptoren für Proteine der Extrazellulärmatrix verbinden die Plasmamembran mit der Unterlage und Aktinfilamente im Zytoplasma treten über aktinbindende Proteine mit den zytoplasmatischen Domänen dieser Rezeptoren in Wechselwirkung. In ihren Einzelheiten sind diese Wechselwirkungen noch nicht geklärt; als sicher gilt, dass die Kontakte zwischen Zellen und Unterlage ständig neu hergestellt und wieder gelöst werden müssen, wenn sich die Zelle fortbewegt.
- **Zug:** Hierbei bewegt sich der Zellkörper vorwärts. Der vordere Teil der Zelle zieht sich wahrscheinlich aktiv wie eine Muskelfaser zusammen und der Zellkern sowie die Hauptmenge des Cytoplasmas werden passiv hinterhergezogen. Nach einer anderen Theorie schiebt sich die aktinhaltige Zellrinde durch die Polymerisation der Aktinfilamente vorwärts, sodass in der Zellrinde eine Spannung entsteht. Die daraus resultierende Kontraktionskraft zieht dann die hinteren Anteile der Zelle nach (Alberts B et al., 2004).

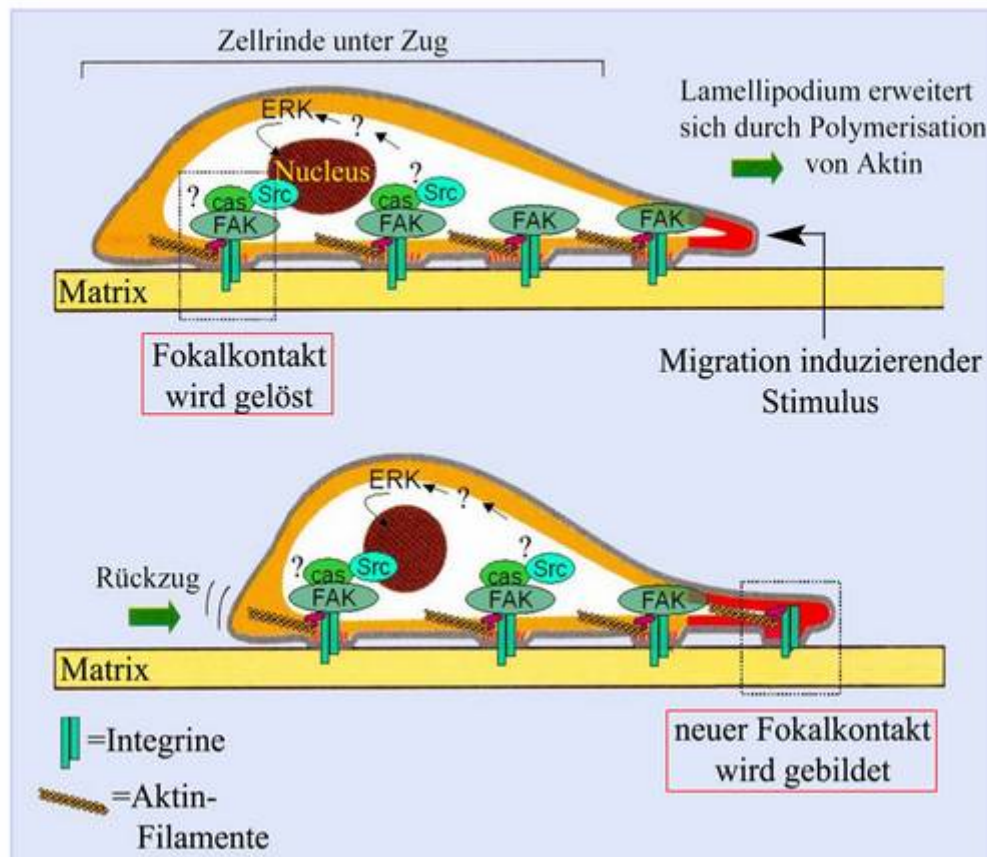


Abbildung 1-7 Modell zur Fortbewegung der Zelle. Durch die aktinabhängige Ausstülpung und feste Anheftung eines Lamellipodiums am Leitsaum dehnt sich die aktinhaltige Zellrinde. Die entstehende Zugkraft zieht die Zelle dabei nach vorne. Es entstehen neue Fokalkontakte, während sich alte auflösen. Der gleiche Kreislauf kann sich ständig wiederholen, wodurch sich die Zelle fortbewegen kann. Das neu polymerisierte Aktin in der Zellrinde ist rot hervorgehoben (In Anlehnung an Alberts B. et al., „Molekularbiologie der Zelle“, 2004, 4. Auflage, S. 1127).

1.7 Wachstumsfaktoren, Zytokine und Fibronectin und ihre Bedeutung für die Zellmigration

Die Migration von intestinalen Myofibroblasten wird wahrscheinlich durch verschiedene Faktoren moduliert, die während des Wundheilungs- und Entzündungsprozesses, von intestinalen Fibroblasten, Myofibroblasten und anderen Zellen verstärkt, sezerniert werden können.

Im Folgenden soll auf Zytokine und das Extrazellulärmatrix-Protein Fibronectin näher eingegangen werden, die in dieser Arbeit auf ihre migrationmodulierende Funktion hin untersucht wurden. Wachstumsfaktoren und Fibronectin spielen zwar vor allem bei der mucosalen Wundheilung eine tragende Rolle, aber ebenso wie TNF und IFN γ können sie auch an Entzündungsprozessen beteiligt sein.

1.7.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren werden von vielen verschiedenen Immun- und Nichtimmunzellen sezerniert und sind wichtige und potente Regulatoren der Migration von Myofibroblasten; sie können die Veränderung des Phänotyps von Zellen steuern um eine Gewebeneubildung im Rahmen der Morphogenese oder Wundheilung hervorzurufen (Xu J et al., 1996). Wachstumsfaktoren modulieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen und sind sowohl für die Ablagerung von Extrazellulärmatrix als auch für deren Degradierung verantwortlich; deshalb spielen Wachstumsfaktoren bei Abwehrmechanismen und Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt eine wichtige Rolle (Dignass AU et al., 2001). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Darm vorhanden ist und somit ein kompliziertes Netzwerk von vielen interagierenden Faktoren existiert. In der intestinalen Mukosa wird zum Beispiel die mRNA von platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) exprimiert (Chowdhury A et al., 1996; Grimm MC et al., 1996; Ito M et al., 1990; Lawrence DA et al., 1984; Lawrance IC et al., 2001; Zimmermann EM et al., 2001).

Neueren Erkenntnissen zu Folge erhöhen PDGF-AB, IGF-I, EGF und TGF- β 1 die autokrin induzierte Migration von intestinalen Myofibroblasten (Leeb S et al., 2002). TGF- β 1 wird in seiner biologisch-inaktiven Form sezerniert. Die Mechanismen, die schließlich zur Aktivierung von latentem TGF- β 1 führen, sind bis heute noch nicht voll verstanden (Dignass AU et al., 2001). TGF- β 1 ist ein wichtiges Stimulans der Proliferation von intestinalen Myofibroblasten (Jobson TM et al., 1998). Es unterstützt den intestinalen Heilungsprozess und spielt eine wichtige Rolle bei der Entzündung und der Reparatur von Geweben (Sturm A et al., 2000).

TGF- β stimuliert die chemotaktische Migration von Endothelzellen, Epithelzellen und stromalen Fibroblasten (Grant NB et al., 1992). Darüber hinaus stimuliert TGF- β die

Migration von Mastzellen (Gruber BL et al., 1994), von Monozyten (Wahl SM et al., 1987) und Hautfibroblasten (Postlethwaite AE et al., 1987). Es hat außerdem eine Schlüsselposition bei der Induktion der Matrixproteinsynthese. Da TGF- β chemotaktisch aktive Substanzen auch neutralisieren kann, ist es beim Beenden der Fibroblastenmigration in das Wundareal von Bedeutung (Goris RJH et al., 1997). Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch liefert S. Leeb, wonach Langzeitkontakt mit TGF- β 1 zu einer Hemmung der Migration von intestinalen Myofibroblasten durch Induktion von α -Aktin führt; dagegen bewirkt ein kurzzeitiger Kon-takt mit TGF- β 1 eine Steigerung der Migrationsleistung (Leeb S et al., 2002).

Des Weiteren hat TGF- β einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion von Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten. McKaig konnte zeigen, dass TGF- β zu einer vermehrten Matrix-Produktion führt und die Entstehung von Stenosen begünstigt (McKaig BC, 2003).

1.7.2 Entzündungs-Mediatoren: TNF und IFN γ

Auch Entzündungs-Mediatoren spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Hier stehen neben der Wundheilung vor allem krankhafte Veränderungen wie zum Beispiel die Bildung von Stenosen, Fisteln und Ulzerationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vordergrund. Die Zytokine TNF und IFN γ werden während der Wundheilung oder einer ablaufenden Entzündung von mononukleären Zellen sezerniert.

In der intestinalen Mucosa von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten wird TNF in großen Mengen von aktivierten Makrophagen produziert (Braegger CP et al., 1994; Elsasser-Beile U et al., 1994; Funakoshi K et al., 1995; Monteleone G et al., 2000; Murata Y et al., 1995). Über den Einfluss von TNF auf die Migration von Fibroblasten gibt es unterschiedliche Erkenntnisse. TNF induziert keine Migration bei Hautfibroblasten und beeinflusst auch nicht deren Migration, die durch fibroblastenkonditionierte Medien oder Fibronektin induziert wurde (Schirren CG et al., 1990). Allerdings soll ein Einwandern von Hautfibroblasten in ein Kollagen1-Gel durch Vorinkubation der Zellen mit TNF verstärkt werden können (Schirren CG et al., 1990). Auch Postlethwaite et al. haben gezeigt, dass pikomolare TNF-Konzentrationen die Fibroblastenmigration induzieren können (Postlethwaite AE et al., 1990). Interferone gelten hauptsächlich als Inhibitoren der Zellbewegung (Brouty-Boye D et al., 1980). IFN α und IFN γ inhibieren die Migration von Hautfibroblasten dosisabhängig (Adelmann-Grill BC et al., 1987). Die Inhibition der

Migration von Hautfibroblasten durch Interferone könnte bei der Wundheilung und bei der Entstehung von Fibrosen ein wichtiger Bestandteil regulatorischer Mechanismen sein. Bei intestinalen Myofibroblasten konnte S. Leeb ähnliche Beobachtungen machen: eine dreitägige IFN γ -Inkubation mit anschließender siebentägiger Passage ohne IFN γ -Zusatz bewirkte eine Senkung des Migrationspotentials von intestinalen Myofibroblasten um 72% (Leeb S, 2003). Darauf aufbauend konnte in der vorangegangenen humanmedizinischen Dissertation, dass MC-CLPF durch IFN γ -Zusatz eine deutliche Reduktion ihres Migrationspotentials erfahren, wohingegen eine Inkubation mit TNF ohne Einfluss auf deren Migrationsleistung bleibt (siehe Abb. 1-8, Meier J, 2005).

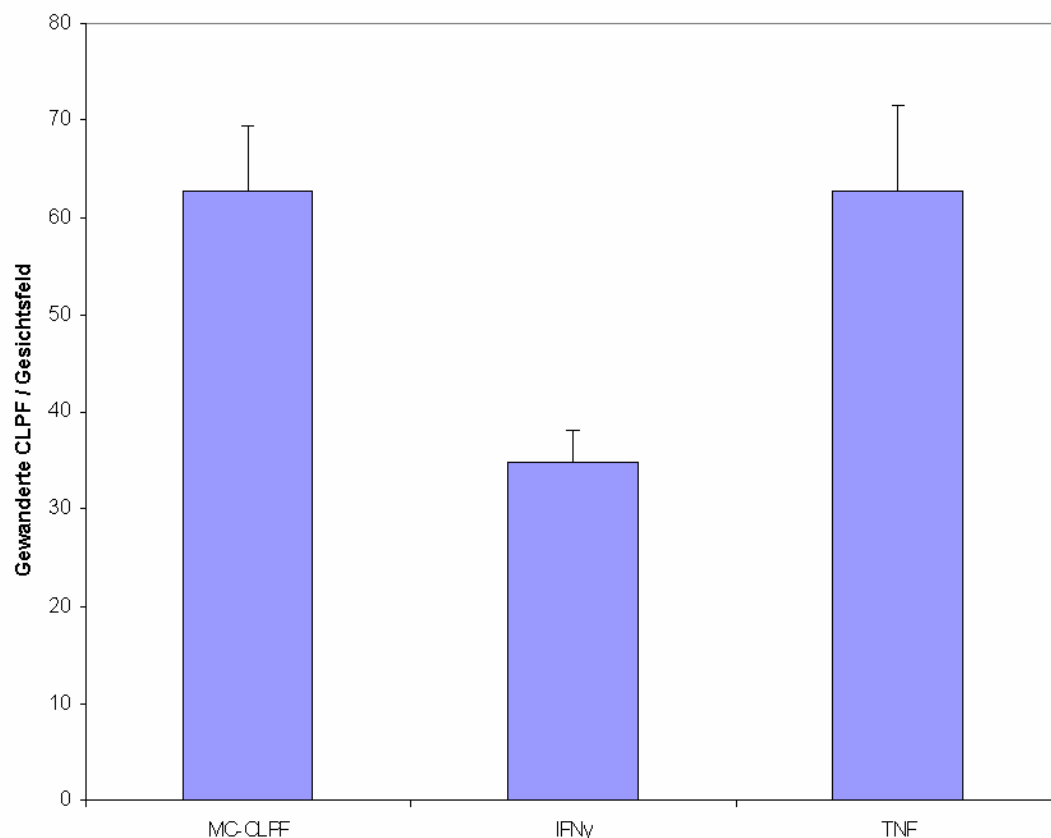


Abb. 1-8 Gewanderte Myofibroblasten nach Inkubation mit IFN γ und TNF im Vergleich zu den unbehandelten MC-CLPF. IFN γ reduziert signifikant das Migrationspotential der CLPF; TNF nicht.

Statistik: *Mann-Whitney rank sum test*: mit IFN γ behandelte versus unbehandelte MC-CLPF: $p < 0,0001$; mit TNF behandelte versus unbehandelte MC-CLPF: $p = 0,95$

1.7.3 Die Extrazellularmatrix-Komponente Fibronectin

In mehreren Arbeiten wird Fibronectin als migrationinduzierende Substanz für Fibroblasten und Myofibroblasten beschrieben (Dean JW et al., 1997; Gauss-Muller V et al., 1980; Grotendorst GR, 1984; Kawamoto M et al., 1997; Maheshwari G et al., 1999; Schor SL et al., 1996). In Hautfibroblasten konnte mit konditioniertem Medium von Hautfibroblasten Migration induziert werden; konditionierte Medien sind Zellüberstände (ohne FCS [fetal calf serum]), die über einen bestimmten Zeitraum auf den Zellen belassen wurden (z.B. 24h). In diesen konditionierten Medien konnte unter anderem Fibronectin als migrationinduzierender Faktor gefunden werden (Mensing H et al., 1983). Von Fibronectin existieren mehrere Isoformen, darunter das lösliche Plasmafibronectin, das vermutlich an der Wundheilung, der Blutgerinnung und der Phagozytose beteiligt ist. Alle anderen Isoformen bilden sich an der Oberfläche von Zellen und werden in der Extrazellularmatrix als unlösliche Fibronectinfilamente abgelagert; hierbei sind Fibronectindimere durch weitere Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Fibronectinmoleküle vereinigen sich nur auf der Oberfläche bestimmter Zellen zu Filamenten, was einen Hinweis darauf gibt, dass zur Bildung von Filamenten weitere Proteine nötig sind. Fibronectin ist nicht nur für die Zellanheftung an die Matrix wichtig, sondern es dirigiert auch die Migration dieser Zellen. Eine kontrollierte Proteolyse von gebundenem Fibronectin durch Metalloproteinasen kann die Zellmigration stark erleichtern. Vermutlich fördert Fibronectin die Zellwanderung, weil es den Zellen hilft, sich an der Matrix anzuheften. Diese Wirkung muss jedoch genau dosiert sein, damit sich die Zellen auf der Matrix anheften können, ohne immobilisiert zu werden (Alberts B et al., 2004).

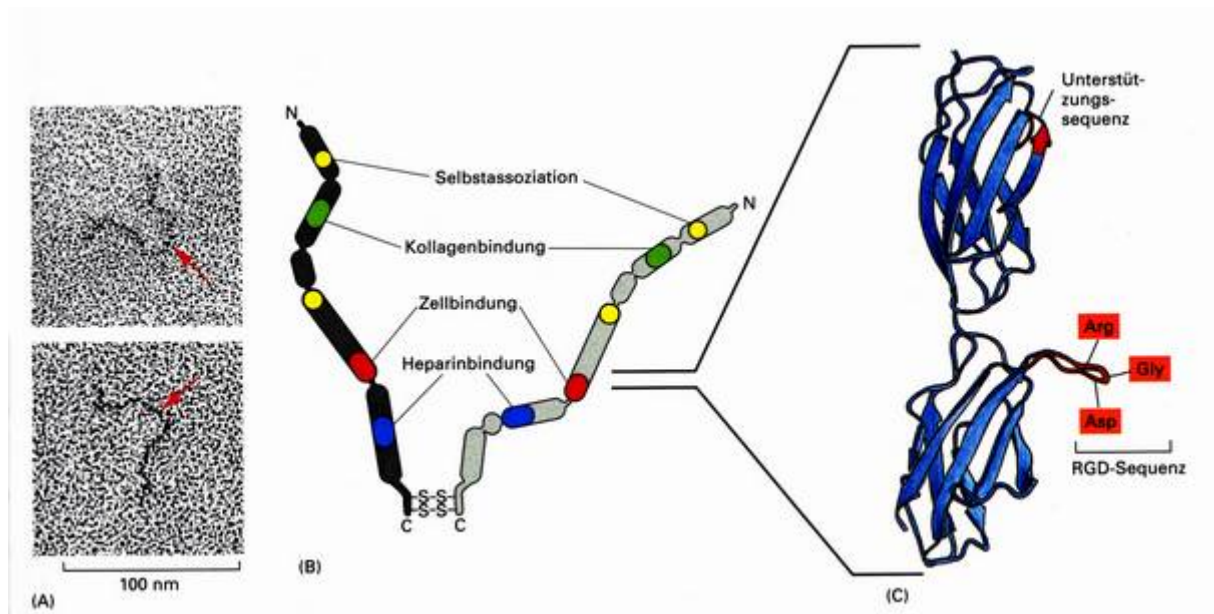


Abb. 1-9 A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Fibronektindimers: Die Pfeile markieren die C-terminalen Enden. B) Struktur eines Fibronektindimers C) Raumstruktur der Haupt-Bindungsstellen für Zellen (in Anlehnung an Alberts B, 2004, 4. Auflage, S. 1281)

Hierauf aufbauend hat S. Leeb gezeigt, dass Fibronectin bei intestinalen Fibroblasten der entscheidende Bestandteil des konditionierten Mediums ist, der die Migration induziert (Leeb S et al., 2004). Während bei intestinalen Zellen von Gesunden nur die Fibronectin-Isoform-A exprimiert vorliegt, sind bei colorectalen Carzinomen sowohl die Isoform A als auch die Isoform B des Fibronectin deutlich vermehrt exprimiert (Pujuguet P et al., 1996). Die Fibronectin-Isoform ED-A ist als die migration-induzierende Variante zu verstehen (Manabe R et al., 1997) wohingegen die Fibronectin-Isoform ED-B unter anderem als ein Marker für Angiogenese und verstärkte Wundheilung dient (Santimaria M, et al., 2003). Ein weiteres Mitglied unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei Morbus Crohn-Myofibroblasten beide Isoformen ED-A und ED-B des Fibronectins deutlich herunterreguliert vorlagen aber nachweisbar waren, während sie bei Fibroblasten aus fistulierten Bereichen ganz fehlten. In Zellen aus stenosierte Arealen dagegen waren die beiden Isoformen verstärkt exprimiert (Brenmoehl J et al., 2004), was den Verhältnissen bei colorectalen Carcinomen ähnelt. Diese Beobachtungen liefern womöglich eine Erklärung für das, in dieser Arbeit beschriebene, unterschiedliche Migrationsverhalten von Morbus Crohn-Myofibroblasten aus stenosierte und fistulierten Bereichen.

Migration induzierend:

Fibronektin

PDGF-AB

TGF- β 1 (kurzzeitiger Kontakt)

IGF-I

EGF

Migration inhibierend:

TNF

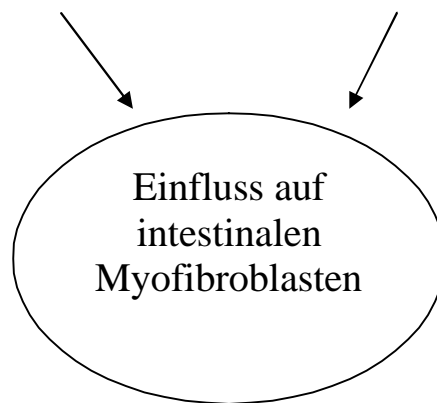
IFN γ TGF- β 1 (langzeitiger Kontakt)

Abbildung 1-10 fasst Faktoren zusammen, welche die Migration von intestinalen Myofibroblasten modulieren.

All diese Faktoren werden in der intestinalen Mucosa exprimiert.

(in Anlehnung an S. Leeb, 2002)

1.8 Mechanismen der Migration mesenchymaler Zellen und Rolle der *Focal Adhesion Kinase* (FAK)

Zur Migration von intestinalen Myofibroblasten liegen bis heute nur wenige Veröffentlichungen vor. Über die Mechanismen der Migration von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und von anderen Zell-Typen existieren allerdings schon diverse Datenmaterialien. Es ist zu vermuten, dass bei der Migration intestinaler Myofibroblasten ähnliche Mechanismen und Faktoren beteiligt sind. Nach (Juliano RL et Haskill S, 1993) spielt die dynamische adhäsive Wechselwirkung zwischen zellulären Oberflächenrezeptoren (Integrinen) und der Extrazellulärmatrrix (ECM) eine Schlüsselfunktion hinsichtlich der Zellbewegung. Der äußere Bestandteil der Integrine bindet an die ECM, der zytoplasmatische Integrinanteil ist an Aktinfilamente in den Stressfasern gekoppelt. Hierbei handelt es sich um eine indirekte Verbindung, die von mehreren Anheftungsproteinen hergestellt wird und als Fokalkontakt oder fokale Adhäsion bezeichnet wird.

Die zytoplasmatische Domäne des Integrins bindet an das Protein Talin, das sich seinerseits an Vinculin heftet. Vinculin lagert sich mit α -Aktin zusammen und wird so an ein Aktin-Filament gekoppelt. Neben der Verankerungsfunktion haben die Fokalkontakte auch die Aufgabe, Signale von der ECM an das Zytoskelett weiterzuleiten. Mehrere Protein-Kinasen sind an den Fokalkontakten lokalisiert (Alberts B et al., 1997). In den fokalen Adhäsionen findet man eine Phosphorylierung von FAK (p125 *focal adhesion kinase* oder pp125_{FAK}). Es wird angenommen, dass FAK und deren Phosphorylierung eine wichtige Rolle in der Zell-Migration spielt, da zum Beispiel FAK-difiziente Zellen eine stark reduzierte Migration zeigen. (Sieg DJ et al., 2000). Sowohl die Menge des zytosolischen FAK als auch dessen Phosphorylierung steigen während der Zellmigration an (Schlaepfer DD et al, 1999; Sieg DJ et al, 1999). FAK ist eine zytoplasmatische rezeptorfreie 125 kDa Protein-Tyrosin-Kinase (PTK), deren Phosphorylierung von einer Vielzahl von Stimuli abhängig ist. Diese Stimuli sind an der Regulierung von Morphologie, Adhäsion und Bewegung der Zellen beteiligt. Bei der Bindung von Integrinen an ECM-Proteine wird FAK an Tyrosin-Resten phosphoryliert. (Sieg DJ et al., 2000).

FAK ist ausserdem Teil eines Zytoskelett-assoziierten Netzwerks von Signalproteinen, zu dem die PTKs der Src-Familie, p130^{Cas}, Shc und Grb2 gehören, die gemeinsam wirken, um Integrin-Signale in die ERK/JNK MAP (*mitogen-activated protein*) Kinase-Kaskade zu übermitteln (Sieg DJ et al., 2000). FAK kann an Proteine binden, die eine Src Homologe 2 (SH2)-Domäne enthalten (Abedi H et al., 1995). SH2-Domänen, die mit FAK assoziieren sind pp60^{src}, GRB-2, p85 α , PLC- γ , Nck, Crk und Csk (Abedi HR et Zachary I, 1995).

Die Ergebnisse von Clyman et al. Zeigen, dass beta 1-Integrine für die Zell-Adhäsion nötig sind, während beta 3-Integrine eine wichtige Rolle bei Chemotaxis und Migration spielen (Clyman RI et al., 1992). FAK verbindet Signaltransduktionswege, die über Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Integrine vermittelt werden. Die durch Liganden-Bindung (z.B. Fibronectin) ausgelöste Integrin-vermittelte Migration kann synergetisch auf die Wachstumsfaktor-vermittelte Migration wirken.

FAK bindet über seine N-terminale Domäne an Wachstumsfaktor-rezeptoren und fördert so die PDGF- und EGF-stimulierte Zell-Migration (Sieg DJ et al., 2000). Wachstumsfaktoren führen wahrscheinlich zu einer erhöhten Expression von Oberflächen-Integrinen, was bestimmte ECM-Proteine zusätzlich verstärken (Gailit J et al., 1997; Schor SL et al., 1996). Dies trägt ebenfalls zum bestehenden Synergismus zwischen Integrin-vermittelter und Wachstums-vermittelter Migration bei. ECM-Komponenten, die in der Zell-Migration eine

agonistische Rolle spielen sind Fibronectin (Xu J et al., 1996), Vitronectin (Naito M et al., 1991), Kollagen Typ 1 und 4 sowie Laminin (Nelson PR et al., 1996).

Die Fibroblastenmigration wird also durch ein komplexes Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Integrin-Expression, FAK-Phosphorylierung und ECM-Proteinen bewirkt. Die Regulierung von Integrin-Expression, FAK- und MAP-Kinasen-Aktivierung sind nur ein kleiner Teil von Mechanismen, die die Zell-Migration beeinflussen. Das Wissen über die Faktoren, welche die Migration beeinflussen und über Mechanismen, die daran beteiligt sind ist noch bei weitem unvollständig. Im Falle der intestinalen Myofibroblasten steht man diesbezüglich erst am Beginn, wobei S. Leeb zeigen konnte, dass in entzündeter Mucosa bei Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa die Expression und Phosphorylierung von FAK reduziert ist. Dies konnte ebenfalls durch eine Inkubation mit TNF und IFN- γ bei normaler Schleimhautmucosa von Kontrollpatienten induziert werden (Leeb S et al, 2003).

1.9 Arbeitsziele

Die zahnmedizinische Promotionsarbeit soll auf den in der humanmedizinischen Promotion erarbeiteten Erkenntnissen aufbauen.

In der genannten Promotion wurden intestinale Myofibroblasten von Morbus Crohn-Patienten mit stenosierenden, fistulierenden und rein entzündlichen Verläufen isoliert und Migrations-Assays in der modifizierten Boydenkammer durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Zellen aus den stenosierten Arealen unabhängig vom konditionierten Medium stärker migrierten als die Zellen aus entzündlich veränderter, nicht fibrosierter Darmschleimhaut. Die intestinalen Myofibroblasten aus Fisteln wanderten signifikant weniger als Zellen aus entzündeter Mukosa.

Zudem wurden Migrations-Assays mit steigenden Konzentrationen von Fibronectin durchgeführt, um den Einfluss von Fibronectin auf das Migrationsverhalten intestinaler Myofibroblasten zu untersuchen. Auch hier zeigte sich, dass Zellen aus stenosierten Mukosa-

Arealen stärker wanderten als Fibroblasten aus entzündeter Darmwand, die wiederum die Zellen aus den fistulierten Arealen in ihrem Migrationspotential übertrafen. Dies spricht für eine gesteigerte Empfindlichkeit der Stenose-Zellen gegenüber Fibronectin. Fistel-Myofibroblasten hingegen scheinen gegenüber Fibronectin relativ unempfindlich zu sein.

Migrations-Assays mit Morbus Crohn-Myofibroblasten, die jeweils drei Tage lang mit IFN γ bzw. TNF inkubiert waren und danach eine Woche normal passagiert wurden, ergaben, dass diese Zellen mit einem signifikant reduzierten Migrationsverhalten reagierten. Dieser migrationshemmende Einfluss von IFN γ auf die Myofibroblasten könnte in der Pathogenese der Fistelentstehung eine wichtige Rolle spielen.

In einem neu etablierten dreidimensionalen Migrationsmodell gelang es im Rahmen der medizinischen Promotionsarbeit, das Migrationsverhalten von Morbus Crohn-Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und entzündeten Arealen in ihrer autokrin produzierten Extrazellulärmatrix zu analysieren. Es zeigte sich, dass die Zellen aus den stenosierten Arealen den mittels Laser erzeugten Defekt am schnellsten verschließen konnten, während die Fibroblasten aus entzündeter Mucosa die Fistel-Zellen hinsichtlich der Geschwindigkeit des Defektverschlusses noch übertrafen. Dies bestätigte die Ergebnisse der Boydenkammer-Experimente und stellte klar, dass die drei untersuchten Zellgruppen unterschiedliche Phänotypen darstellen.

Die Ergebnisse legen daher nahe, dass sich die drei untersuchten Zellgruppen (intestinale Fibroblasten aus stenosierten, fistulierten und nur entzündlich veränderten Bereichen) hinsichtlich ihres Migrationspotentials deutlich voneinander unterscheiden und auch auf Reize wie Kontakt mit Fibronectin oder TNF und IFN γ unterschiedlich reagieren. Bei allen Versuchen wurde deutlich, dass intestinale Morbus Crohn-Myofibroblasten aus stenosierten Arealen im Vergleich zu CD-CLPF aus entzündeter Mucosa ein gesteigertes Migrationspotential besitzen und dass intestinale Morbus Crohn-Myofibroblasten aus fistulierten Bereichen signifikant weniger migrieren als die CD-CLPF aus rein entzündlich veränderter Schleimhaut.

Die aktuelle Arbeit soll diese Daten aufgreifen und zugrunde liegende Mechanismen untersuchen.

ZIELE UND ARBEITSPLAN

1. Mittels Dreifachbestimmung sollte das Migrationsverhalten von Zellen aus stenosierter, fistulierter und nicht veränderter Morbus Crohn-Mucosa innerhalb einer dreidimensionalen von den Zellen selbst synthetisierten Matrix über einen Zeitraum von 36h verglichen werden. Hierzu wurde das in der humanmedizinischen Promotionsarbeit bereits etablierte 3D-Modell mit Laserzelllyse verwendet.

In einer Arbeit von S. Leeb konnte gezeigt werden, dass als biochemisches Korrelat für die unterschiedlichen Migrationspotentiale von CD-CLPF eine reduzierte Phosphorylierung und Expression der *Focal-Adhesion-Kinase* (FAK) anzusehen ist. Durch TNF und IFN γ ließ sich eine ähnlich dauerhafte reduzierte Migration bei Darmfibroblasten von gesunden Patienten induzieren (Leeb S et al., 2003).

2. Deshalb sollte die Expression der *Focal-Adhesion-Kinase* (FAK) bei CD-CLPF aus stenosierten, fistulierten und nicht stenosierten oder fistulierten Arealen mittels Western-Blot untersucht und miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden CD-CLPF aus stenosierten, fistulierten und nur entzündlich veränderten Arealen in einem Verwundungsexperiment 4h und 8h nach Verwundung eines konfluenten Monolayers lysiert. Die resultierende FAK Expression wurde schließlich mit ruhenden CD-CLPF (0h, verwundet) verglichen um mögliche Unterschiede in der Migrationsregulation durch FAK aufzeigen zu können.

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien und Kits

2.1.1 Zellkultur

Amphotericin	Biochrom, Berlin
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Ciprobay 200	Bayer, Leverkusen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM)	PAA, Linz/Aut
High Glucose	
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Systems, Aidenbach
Gentamycin	Biochrom, Berlin
MEM-Vitamine	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco BRL, Eggenstein
Ohne Calcium, Magnesium	
Penicillin/Streptomycin-Mischung	PAN Systems, Aidenbach
Tryptanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin ohne/mit EDTA	Biochrom, Berlin
Gelatinlösung in PBS	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.2 Immunhistochemie

Universal DAKO-APAAP-Kit	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Aceton	Merck, Darmstadt
Glycergel	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

Mayer`s Hematoxylin-Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt

2.1.3 Migrations-Assays in der modifizierten Boydenkammer

2.1.3.1 Zytokine

Interferon γ (IFN γ)	Roche, Mannheim
Tumor Necrosis Factor (TNF)	Knoll AG, Ludwigshafen

2.1.3.2 Extrazellulärmatrrixproteine

Fibronektin (aufgereinigt aus humanem Plasma)	Chemicon International, Hofheim
---	---------------------------------

2.1.4 Western Blot und Vorarbeiten

2.1.4.1 Lysepuffer

3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonium]-1-Propansulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Complete Mini Tabletten	Boehringer, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonat] (HEPES)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.4.2 Proteinbestimmungen

Bicinchoninic Acid Solution (BCA Solution)	Sigma-Aldirch Chemie, Taufkirchen
Copper(II)sulphate Pentahydrate 4% Solution	Sigma-Aldirch Chemie, Taufkirchen

2.1.4.3 Größenstandarts (Marker)

Rainbow coloured protein molecular weight markers	Amersham Life Science, Braunschweig
SeeBlue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4.4 Gradientengele

NuPAGE- Gradientengele, 1mm, 1.5 mm	Invitrogen, Karlsruhe
-------------------------------------	-----------------------

2.1.4.5 Running- und Transfer-Puffer

Running-Buffer 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Transfer-Buffer 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt

2.1.4.6 Waschpuffer

Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.4.7 Detektion

Ponceau S	Fluka, Buchs
ECL-Plus	Amersham Life Science, Braunschweig

2.1.4.8 Antikörper

Anti-Focal Adhesion Kinase Antikörper (Maus anti-human), HRP-linked, Klon 4-4A	Chemicon International, Hofheim
---	---------------------------------

Anti-Aktin Antikörper (Maus anti-human), HRP-linked, Klon C4	Chemicon International, Hofheim
---	---------------------------------

2.1.4.9 Positiv-Kontrolle

3T3 Zell-Lysat	Upstate, Lake Placid/USA
----------------	--------------------------

2.1.4.10 Stripping

Re-Blot Plus, Western Blot Recycling Kit	Chemicon International, Hofheim
--	---------------------------------

2.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Chamber-slides, 2 und 8 well	Brand, Wertheim
Deckgläser 24x60mm	Laborcenter, Nürnberg
Einmal-Pipetten, steril	Costar, Cambridge/USA
Einmal-Skalpell	pfm, Köln
Immersionsöl	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kanülen	Becton-Dickinson, San Jose/USA
Kapillarspritzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Objektträger 76x26mm	Laborcenter, Nürnberg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pinzetten	Labor, Schubert&Weiß, Iphofen
Petrischalen 100x20mm	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polycarbonatmembranen, 25x80 mm (8µm Poren)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Stericup Vakuum-Filtereinheiten mit Auffanggefäß	Milipore, Eschborn
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Falcon, Heidelberg

2.3 Geräte

2.3.1 Laborausstattung

Analysewaage, sartorius analytic A120S	Sartorius, Göttingen
Autoclav sanoclav	Wolf, Geislingen
Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioMAX TranScreen HE	Kodak, Rochester/USA
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Densitometer	Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech; Braunschweig
Digitale Bildverarbeitungsanlage	Visitron Systems, München
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Lamin Air Sterilbank	Heraeus, Hanau
Liquitherm FV, Heizbad	Labora Mannheim, Mannheim
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Megafuge 1,0R	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Mikroskop	Olympus, Stuttgart
Milipore Wasserfiltrationsanlage	Milipore, Eschhorn
Modified Boyden Chamber	Receptor Technologies Ltd., Adderbury/GB
Neubauer Zählkammer improved	Blaubrand, Wertheim
Ph-Meter	Beckmann, München
Pipetboy acu	Tecnomara, Ruhberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reagenzglas-Rotator	Heidolph, Kehlheim
Schüttelapparat	peqlab, Erlangen
Sonorex Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	Heidolph, Kehlheim

2.3.2 Lasertechnik

Erbium:YAG Laser Gerät MCL 29

Aesculap Meditec

Dermablate

Schutzbrille

Uvex

Aufsatz für Laserkopf (5 cm)

Aesculap Meditec

Brutraum

Klimatechnik, Regensburg

Digitalkamera FinePix

Fuji, Japan

3 Methoden

3.1 Isolation und Kultur von primären humanen intestinalen Myofibroblasten

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden mit primären intestinalen Myofibroblasten-Kulturen von Morbus Crohn-Patienten durchgeführt. Es wurden jeweils Myofibroblasten aus der intestinalen Mucosa von Morbus Crohn-Patienten, bei denen Stenosen auftraten, und aus der intestinalen Mucosa von Morbus Crohn-Patienten mit fistulierendem Verlauf isoliert. Als Kontrolle dienten Morbus Crohn-Myofibroblasten (MC-CLPF) aus rein entzündlich veränderten Darmarealen. In Tabelle 3-1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Myofibroblasten-Kulturen aufgelistet. Die Isolation der intestinalen Myofibroblasten erfolgte über einen Kollagenaseverdau:

In 10ml Hank's Solution mit 40µl 0,5 M EDTA wurden 6 Mukosastücke (je ca. 1 mm² groß) 20 Minuten lang bei 37°C geschüttelt. Im Überstand befanden sich die abgelösten Epithelzellen, die verworfen wurden. Anschließend wurden je 3 Biopsien in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, in dem 700µl PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺, 250µl Kollagenase I (4 mg/ml), 30µl DNase (10 mg/ml) und 20µl Hyaluronidase (100mg/ml) vorgelegt waren. Nach 30-minütigem Schütteln bei 37 °C wurde der Überstand verworfen und der Kollagenaseverdau wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt.

Durch wiederholte Zentrifugation (Biofuge pico, 5 min mit 3500 rpm bei RT) und Resuspension wurden die isolierten Zellen mit Medium gewaschen. Schließlich wurden sie in sterilem Medium in eine sterile 25 cm² Flasche überführt.

Sobald die Myofibroblasten konfluent gewachsen waren, wurden sie nach Abtrypsinieren (0,5% Trypsin in PBS) und Sedimentation durch Zentrifugation (Megafuge, 1200 rpm, 5 min, RT) in Petrischalen (100x20mm) in einem Inkubator mit 10%-iger CO₂-Atmosphäre und 37°C Temperatur weiter kultiviert, wobei die Zellen im Abstand von 4 Tagen mit neuem Zellkulturmedium versorgt wurden. Nachdem die Zellen dicht genug gewachsen waren, wurden sie mit einer 0,5%-igen Trypsinlösung (ohne EDTA) bei 37°C ca. 5-10 min lang behandelt und durch sanftes Klopfen und Spülen vom Schalenboden gelöst, durch Zentrifugation (Megafuge, 1200 rpm, 5 min, RT) sedimentiert, mit Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1 zu 3 in neue Petrischalen aufgeteilt. Für die dargestellten Versuche wur-

den intestinale Myofibroblasten in den Passagen 3-8 eingesetzt. Abbildung 3-1 zeigt eine bei 800-facher Vergrößerung aufgenommene Morbus Crohn-Myofibroblastenkultur.

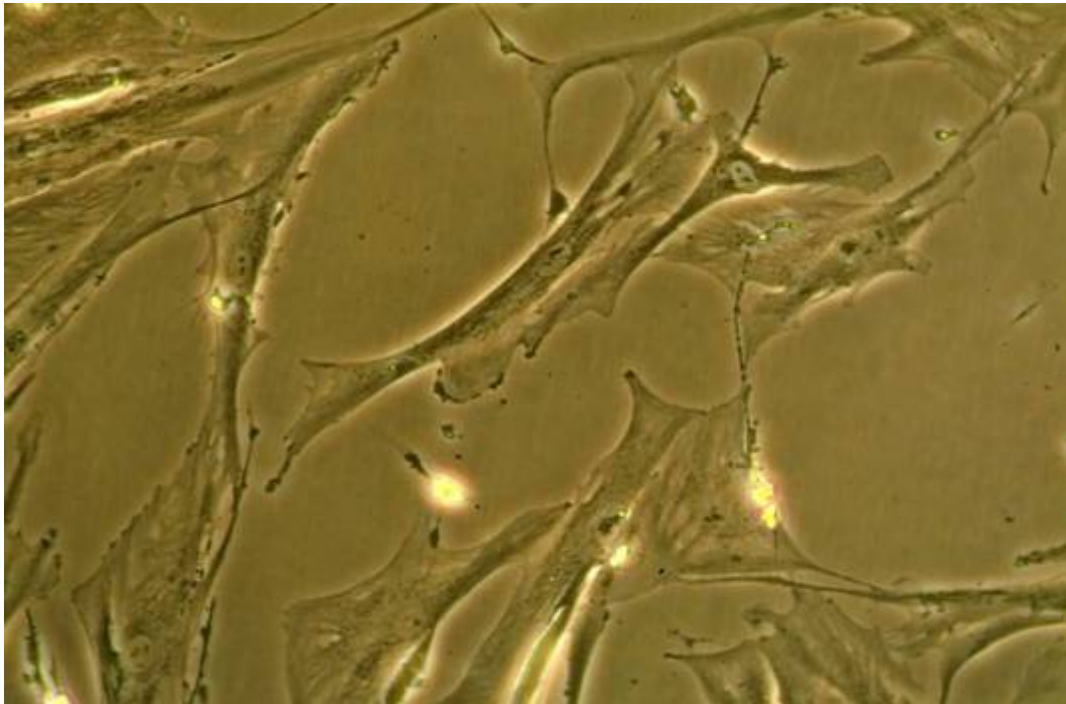


Abbildung 3-1 Humane primäre intestinale Morbus Crohn-Myofibroblasten (800fach vergrößert)

Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums:

500 ml	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose 4,5 g/ml
50 ml	Fötales Kälberserum (FCS), 10x
5 ml	MEM-Vitamine, 100x
5 ml	Nichtessentielle Aminosäuren (NEA), 100x
5 ml	Natriumpyruvat (NaPyr), 100mM
5 ml	Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep), 10000 IE/ 10mg/ml
2 ml	Ciprofloxacin, 2 mg/ml
500 µl	Gentamycin, 50 mg/ml
500 µl	Amphotericin B, 1 mg/ml

Tabelle 3-1 Aufzählung und Charakterisierung der in den Versuchen verwendeten intestinalen Myofibroblasten

Nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	Entnahme-Stelle	Veränderung
62	28	männlich	Morbus Crohn	C.ascendens	Stenose
63	28	männlich	Morbus Crohn	Sigma	Kontrolle
67	32	weiblich	Morbus Crohn	Terminales Ileum	Stenose
68	32	weiblich	Morbus Crohn	C.transversum	Kontrolle
69	32	weiblich	Morbus Crohn	Rectum	Stenose
72	23	weiblich	Morbus Crohn	Rectum	Fistel
105	24	weiblich	Morbus Crohn	C.ascendens	Stenose
123	36	weiblich	Morbus Crohn	Terminales Ileum	Stenose
124	36	weiblich	Morbus Crohn	Coecum	Kontrolle
141	51	weiblich	Morbus Crohn	Terminales Ileum	Fistel
149	41	männlich	Morbus Crohn	C.ascendens	Fistel

Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums:

500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose (4,5g/ml)

5 ml MEM-Vitamine , 10x

5 ml Nichtessentielle Aminosäuren (NEA) , 10x

5 ml Natriumpyruvat (NaPyr) , 10 mM

5 ml Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep) , 10000 IE / 10 mg/ml

2 ml Ciprofloxacin, 2 mg/ml

500 µl Gentamycin, 50 mg/ml

500 µl Amphotericin, 1 mg/ml

3.2 Herstellung der dreidimensionalen Myofibroblastenmatrix

3.2.1 Hintergrund

Noch vor einigen Jahren betrachtete man die Extrazellulärmatrix (ECM) als ein passives Gebilde, das den Zellen lediglich als strukturelle Stütze dient. In letzter Zeit wurde in diversen Arbeiten gezeigt, dass die Extrazellulärmatrix vielmehr ein dynamisches Konstrukt ist, das eine Reihe von physiologischen Prozessen induzieren kann. Über Integrine kommt es zur Regulation von Zellwachstum, Migration, Differenzierung und Organisation von Zellen zu einer Gewebeform. Auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen spielt die ECM eine bedeutende Rolle: in entzündeten Geweben findet ein gesteigerter ECM-Umbau statt (Korhonen M. et al., 2000), was zu morphologischen Veränderungen der Gewebearchitektur führt. McKaig konnte nachweisen, dass im Darm eine vermehrte ECM-Produktion die Entstehung von Stenosen begünstigt (McKaig BC et al., 2003). Auch Kirkegaard begründet die Entstehung von Fisteln bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch Veränderungen der ECM (Kirkegaard T. et al., 2004). Aufgrund der Bedeutsamkeit der ECM für die im Körper ablaufenden Vorgänge war es wünschenswert, ein Modell zu konstruieren, mit dem das Verhalten von humanen intestinalen Fibroblasten in ihrem physiologischen Umfeld simuliert und analysiert werden konnte. Für eine geregelte Kommunikation der Zellen untereinander spielen sowohl die Zell-Zell-Verbindungen als auch die Kontakte der Zellen mit der umgebenden Matrix eine herausragende Rolle. Die Zell-Matrix-Verbindungen sind in drei Hauptgruppen zu unterteilen:

die *fokale Adhäsion*, die *fibrilläre Adhäsion* und die *dreidimensionale Matrixadhäsion*.

Um sich diese herstellen zu können benötigen die Zellen neben einer hohen Zelldichte ausreichend Zeit (Cukiermann E. et al., 2001) für die Synthese. Dieses 3D-Matrix-Modell wurde in der humanmedizinischen Promotionsarbeit etabliert um Migrationsversuche näher an den Verhältnissen *in vivo* durchführen zu können. In dieser Promotionsarbeit wurden MC-CLPF aus stenosierten, fistulierten und lediglich entzündlich veränderten Arealen in einem Dreifachansatz über einen Beobachtungszeitraum von 36h hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens verglichen.

3.2.2 Vorbereitungen

Die *2-well-chamber-slides* wurden mit 0,5ml einer 0,2% Gelatinelösung befüllt und für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit aspiriert und durch 0,5ml PBS ersetzt um ein Austrocknen zu verhindern.

3.2.3 Matrix

Ein 80%-konfluent Zellrasen wurde nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS nun mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturschale gelöst und die Myofibroblasten in Matrixmedium überführt. Danach wurden die Zellen gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen pro ml verdünnt. Nun wurde das PBS von den vorbereiteten *2-well-chamber-slides* aspiriert und verworfen. Auf der von Gelatine bedeckten Oberfläche wurden dann 2ml der Myofibroblasten-Suspension ausgesät und für 24h kultiviert. Danach sollte das Medium gewechselt werden. Die nächsten fünf Tage wurde das Medium alle 48h durch neues ersetzt. Nach sechs Tagen hatten die Myofibroblasten autokrin eine dreidimensionale Matrix erstellt, die ihnen als Leitstruktur und Halteapparat dienen konnte.

3.3 Zelllyse mittels Erbium:YAG-Laser

3.3.1 Hintergrund

Seit Ende der achtziger Jahre findet der in dieser Arbeit verwendete Erbium Laser bei unterschiedlichen medizinischen Indikationen Anwendung. Der größte Vorteil dieses Lasersystems mit Wellenlängen um die $3\mu\text{m}$ nahe des Infrarotbereichs ist die hervorragende Absorption in Gewebeflüssigkeiten oder in hartem Gewebe wie zum Beispiel Knochen. Daraus ergeben sich eine sehr geringe optische Eindringtiefe und damit auch ein möglichst geringer thermischer Schaden am Gewebe. Ein weiterer Vorteil gegenüber UV-Lasern ist, dass Laserstrahlung nahe am Infrarotbereich nicht mutagen ist.

Der gute Gewebeabtrag bei minimaler Koagulationszone und die Tatsache, dass Erbium-Laser relativ simpel zu konstruieren sind, führen dazu, dass sie in der Medizin immer weiter

auf dem Vormarsch sind. So finden Erbiumlaser-Systeme aufgrund ihrer positiven Eigenschaften vor allem in letzter Zeit sowohl in der ästhetischen Chirurgie (Fincher EF et al., 2004; Alster TS et al., 2004; Nocini PF et al., 2003) als auch in der operativen Ophthalmologie (Joseph DP et al., 2004; Radner G et al., 2004; Pallikaris IG et al., 2003) immer mehr Verwendung. In der Dermatologie kommt dieses System vor allem bei der Entfernung von epidermalen Nävi zum Einsatz (Pearson IC et al., 2004). Schon seit mehreren Jahren wird der Erbiumlaser in den dentoalveolären Fachgebieten zur Patientenbehandlung genutzt. So wird er in der Parodontologie (Ishizaki NT et al., 2004; Ishikawa I et al., 2004) und in der maxillo-fazialen Chirurgie (van As G. et al., 2004) vor allem wegen seiner geringen thermischen Belastung für das umgebende Gewebe eingesetzt. Zu Dekontaminationszwecken dient der Erbiumlaser in der Implantologie (Miller RJ et al., 2004) und der Endodontologie (Flax HO et al., 2004).

Für den Laserprozess verantwortlich sind Erbium-Ionen (Er^{3+}); im Festzustand Yttrium-Aluminium-Garnet (YAG) oder Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet (YSGG). Um Laseremission im medizinischen Bereich von $3\text{ }\mu\text{m}$ zu erzielen wird üblicherweise eine Erbiumkonzentration von 30-50 % ($4\text{-}7 \times 10^{21}\text{ cm}^{-3}$) verwendet.

In den meisten Fällen werden Erbium-Laser mittels Xenon- oder Krypton-Lampen optisch gepumpt. Um eine noch größere Laseraktivität zu erreichen werden manchmal Cr^{3+} - oder Tm^{3+} - Ionen zusätzlich eingesetzt.

Der $2,94\text{ }\mu\text{m}$ *Er:YAG-Laser* entsendet Licht bei Wellenlängen, die einen sehr hohen Absorptionskoeffizienten haben und deswegen eine sehr geringe Eindringtiefe in Wasser aufweisen. Dies ermöglicht eine schnelle und genaue Gewebeabtragung bei minimalem thermischen Schaden und Koagulationszone. Das Lasersystem findet immer mehr Anwendung in verschiedenen medizinischen Fachrichtungen, auch weil die Systeme immer kompakter und praktikabler werden; durchschnittliche Outputleistungen von bis zu 30 Watt werden bei einer Effizienz von 1-2% erreicht. All diese Eigenschaften prädestinieren den Erbium-Laser für den Einsatz in dieser Arbeit, bei der eine kreisrunde Zelllyse bei erhaltener Matrixstruktur und minimaler Nekrosezone erwünscht ist.

3.3.2 Erzeugung eines kreisrunden Defektes im Zellrasen bei erhaltener ECM

Um die Migration der Myofibroblasten am besten beobachten zu können wurde in dem Zellrasen von insgesamt 9 Morbus Crohn-Patienten (jeweils 3 mit rein entzündlichem,

stenosierendem und fistulierendem Verlauf) unter Schonung der Extrazellulärmatrix eine zylinderförmige Lyse von 1cm Durchmesser mittels Laserstrahlung (Abbildung 3-2 und 3-3: Lasergerätschaften) gesetzt; nachdem das Medium kurzzeitig vom Zellrasen abgesaugt worden war, wurde der Laserkopf senkrecht auf die Matrix gerichtet und eine Strahlung von 200 mJ und 1 Hz abgegeben. Die abgelösten Zellfragmente wurden mit Medium abgespült und der Zellrasen mit neuem CO₂-unabhängigen Medium bedeckt. Danach wurde der 2-well-chamber-slide sofort auf dem Mikroskoptischchen fixiert und der Beobachtungszeitraum begann. Die einsetzende Migration wurde unter konstanten Laborbedingungen im Brutraum (37°C; 10% CO₂ ; alle 8h Wechsel des CO₂-unabhängigen Mediums) mit einem invertierten Mikroskop (Abbildung 3-4: 2-well-chamber-slide auf Mikroskoptischchen) beobachtet, digital fotografiert (Abbildung 3-5: am Mikroskop angebrachte Digitalkamera) und am Rechner sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet; Kriterium waren die pro Zeiteinheit über den Grenzbalken in den Defekt eingewanderten Zellen.



Abb. 3-2 Erbium-YAG:Lasers

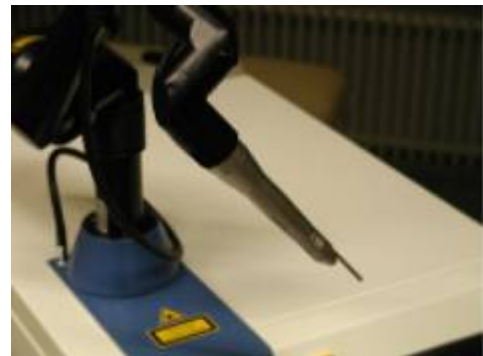


Abb.3-3 Laserkopf mit Aufsatz

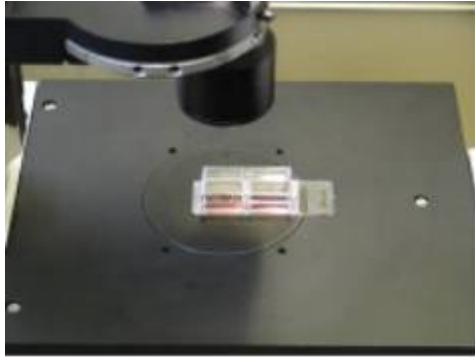


Abb.3-4 2-well-chamber-slide auf Mikroskoptisch



Abb.3-5 Digitalkamera am Mikroskop befestigt

3.3.2.1 Ablauf

Die 2-well-chamber-slides, auf denen die Myofibroblasten innerhalb von sechs Tagen eine Matrix erzeugt hatten, wurden auf die Bestrahlung vorbereitet, indem das PBS aspiriert und durch ein CO₂-unabhängiges Medium (Migrationsmedium) ersetzt wurde. Zur Bestrahlung wurde das Migrationsmedium kurzzeitig abgesaugt und der Laserkopf mittig im Lot auf den Zellrasen gesetzt. Die folgende Bestrahlung erfolgte mit 200 mJ sowie 1 Hz und erzeugte im Zellrasen einen zylinderförmigen Defekt von 1cm Durchmesser, wobei die Matrix unversehrt blieb; die lysierten Zelltrümmer mussten sodann mit Medium vorsichtig abgespült werden. Der verbliebene Zellrasen wurde wieder mit CO₂-unabhängigem Medium (Migrationsmedium) bedeckt. Um eine Proliferation der Zellen auszuschließen und um ausschließlich die Migration der bereits vorhandenen Zellen beobachten zu können wurde zum Migrationsmedium noch Mitomycin in der Konzentration 1µl/ml Medium gegeben. Nach Überführung in den Brutraum, in dem sich das Mikroskop mit der angebrachten Digitalkamera befand, konnte nun das erste mikroskopische Bild (T=0h) aufgenommen werden.

3.3.2.2 Dokumentation

Alle 4h wurde eine Aufnahme der Migrationsverhältnisse gemacht, wobei das Medium alle 8h gewechselt werden musste. Das 2-well-chamber-slide blieb die ganze Beobachtungszeit von

36 Stunden konstant unter dem Mikroskop fixiert und durfte unter keinen Umständen verschoben werden.

Die so gewonnenen Daten wurden ausgewertet und erlaubten es, eine Aussage über das Migrationsverhalten von Morbus Crohn-Myofibroblasten aus entzündeter Mucosa im Vergleich zu Fibroblasten aus Stenosen oder Fisteln zu machen. Diese *in vitro* Ergebnisse ermöglichten Rückschlüsse auf die Verhältnisse *in vivo*, da sich die Myofibroblasten während des Migrationsversuchs, ähnlich den physiologischen Verhältnissen, in ihrem unversehrten und von ihnen autokrin synthetisierten dreidimensionalen Matrixgerüst bewegen konnten und die ganze Zeit über Brutkammeratmosphäre herrschte.

3.4 Vorarbeiten für den Nachweis der Focal Adhesion Kinase (FAK) auf Proteinebene

3.4.1 Verwundung eines konfluenten *Monolayers* und Induktion der Migration von CD-CLPF

Die CD-CLPF aus stenosierten, fistulierten und lediglich entzündeten Arealen wurden in je 9 Petrischalen kultiviert. Zusätzlich erfolgte die Kultivierung von konfluenten Kontroll-Myofibroblasten (ohne Entzündung) über 3 Tage mit TNF (20 ng/ml) und IFN- γ (10 ng/ml). Vor der Verwundung wurden die Myofibroblasten über Nacht mit Kultur-Medium ohne FCS gehungert. Im Anschluss erfolgte die Verwundung, indem mit einem Kamm durch die konfluenten Zellrasen Spuren gezogen wurden. Hierzu wurde der Kamm auf einem Radius der Schale aufgesetzt und diese einmal um 360° gedreht. Das Medium mit den gelösten Myofibroblasten wurde abgekippt und durch neues ersetzt. Ab dem Zeitpunkt der so erfolgten Migrationsinduktion wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 0h, 4h und 8h in jeweils 3 Schalen lysiert.

3.4.2 Lyse der Fibroblasten

Nach der Entnahme des Mediums aus den Petrischalen erfolgte eine zweimalige Wäsche mit kaltem PBS. Danach wurden die Zellen abgeschabt und in kaltem PBS aufgenommen sowie in 50 ml-Tubes überführt. Nach Abzentrifugation (Megafuge, 1200 rpm, 5 min, 4°C) wurde

der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 150 µl Lysepuffer lysiert. Das erhaltene Lysat wurde nach Überführung in ein 1,5 ml Plastik-Tube mit kurzen Impulsen 10mal ultrabeschallt um die Zellen aufzuschließen. Vor der Kryokonservierung bei -20°C erfolgte noch eine Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen mit anschließender Überführung in neue 1,5 ml-Tubes.

Zusammensetzung von 10 ml Lyse-Puffer:

HEPES	10mM
Saccharose	1%
CHAPS	0,01%
PMSF	1mM
DTT	0,1 mM
Natriumorthovanadat	1mM
Complete Mini Tablette (Mix aus 1 Proteaseinhibitoren)	

3.4.3 Proteinbestimmung mittels *Bicinchoninic acid (BCA)-Test*

Der BCA-Test dient zur spektrophotometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. In wässriger alkalischer Lösung wird Cu^{2+} durch Protein zu Cu^{1+} reduziert. Cu^{1+} bildet mit zwei BCA-Molekülen einen farbigen Komplex dessen Absorption im ELISA-Reader bei 562 nm gemessen wird.

Die Myofibroblasten-Lysate wurden 1:50 und 1:100 verdünnt und in einer 96-Well Platte zusammen mit einer BCA-Verdünnungsreihe bekannter Proteinkonzentration vermessen. Durch die Auftragung der Absorption gegen die entsprechende BCA-Proteinkonzentration erhält man eine Eichgerade, aus der der Proteingehalt des Lysats bestimmt werden kann.

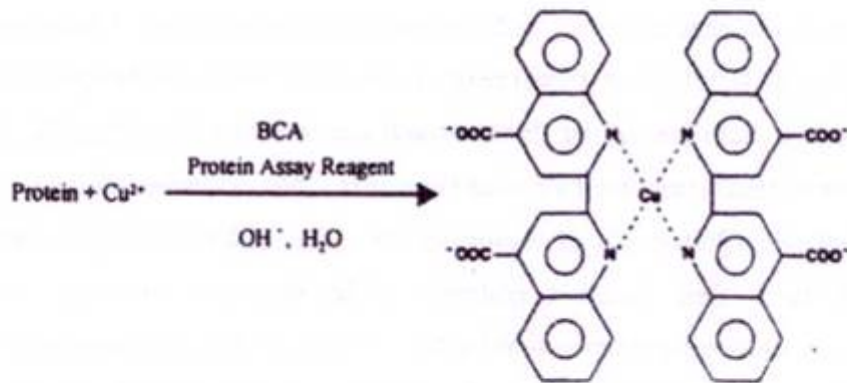


Abb. 3-6 Reduktion von Cu^{2+} und anschließende Komplexbildung mit BCA (Pierce, Produktbeschreibung)

3.5 Nachweis von *Focal Adhesion Kinase* (FAK) mittels Gelelektrophorese und *Western Blotting*

3.5.1 Elektrophoretische Eigenschaften von Proteinen und Struktur von Polyacrylamidgelen

Proteine enthalten als amorphe Makromoleküle unterschiedliche Anteile an positiv (Lysin und Arginin) und negativ (Asparat, Glutamat) geladenen sowie ionisierbaren (Histidin und Cystein) Aminosäureresten. Dies gestattet eine elektrophoretische Mobilität von Proteinen, die in einer porösen Gelmatrix nicht nur von Form und Größe der Proteine sondern auch von der Nettoladung abhängt.

Um eine Proteinauftrennung nach der Größe zu erreichen ist eine Behandlung mit einem anionischen Detergens wie Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie mit schwefelbrückenspaltenden Thiolreagenzien wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol nötig. Hierbei kommt es zur vollkommenen Denaturierung der Proteine und Zerlegung in deren

Untereinheiten. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden die Polypeptidketten gleichmäßig mit dem negativ geladenen SDS versehen, was die Proteineigenladungen überdeckt. So entstehen SDS-Proteinmizellen, die hydrodynamisch äquivalente Konformationen haben (Stoke-radius proportional zum Molekulgewicht) und gleiche Ladungsdichte pro Längeneinheit besitzen. Dies ermöglicht eine elektrophoretische Proteintrennung nach der Größe durch unterschiedliche Retardierung innerhalb der Gelmatrix („Molekularsieb“).

Polyacrylamid wird als Trennmittel verwendet und die Vinyladditions-Polymerisationsreaktion wird durch freie Radikale gestartet, welche bei der Wechselwirkung zwischen Ammoniumpersulfat (APS) und dem tertiären aliphatischen Amin Tetramethylethylendiamin (TEMED) entstehen. TEMED katalysiert den APS-Zerfall in Sulfatradikale: $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 \cdot SO_4^-$.

Diese Sulfatradikale aktivieren TEMED indem sie ihm ein Elektron entreissen. Die so aktivierten TEMED-Moleküle fungieren als Startradikale und reagieren mit den Acrylamidmonomeren wodurch die radikalische Kettenreaktion gestartet wird. Es entsteht ein komplexes dreidimensionales Netz mit bestimmter Porengröße, welche entscheidend für die Trenneigenschaften des Gels ist (Eckert und Kartenbeck, 1996).

3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das am häufigsten verwendete System ist das diskontinuierliche nach Laemmli (1970), welches auf dem „Disk-Elektrophorese-Prinzip“ nach Ornstein und Davis (1964) aufbaut. Diskontinuierlich bezieht sich auf die Gelstruktur, den pH-Wert und die Art sowie Konzentration der Ionen in den verschiedenen Puffern. Im Gel ist ein großporiges Sammelgel einem engporigen Trenngel aufgelagert. Der Elektrodenpuffer enthält Tris-Glycin (pH 8,8), Proben- und Sammelpuffer enthalten Tris-HCl (pH 6,8) und der Trenngelpuffer Tris-HCl (pH 8,8). Nach Anlegen einer Spannung bewegen sich die Cl-Ionen als sogenannte Leitonen, während die Glycinmoleküle zurückbleiben (Folgeionen). Die Glycinmoleküle liegen beim pH des Proben- und Sammelpuffers hauptsächlich als Zwitterionen mit der Nettoladung 0 vor:



Zwischen den Leit- und Folgeionen bildet sich eine Zone geringer Ionendichte aus, was geringe Leitfähigkeit und hohen elektrischen Widerstand bedeutet. Da ein konstanter Stromfluss über das gesamte System aufrechterhalten wird bildet sich wegen $U=I \cdot R$ in dieser Zone ein steiler Feldstärke-Gradient aus. Hier werden die SDS-Proteinkomplexe konzentriert, so dass sie in einer schmalen Zone auf das Trenngel gelangen.

Im Trenngel bewirkt der Anstieg des pH-Wertes eine Negativladung des Glycin:



Das negativ geladene Glycin überholt die Proteine, welche wegen ihrer Größe im engporigen Trenngel durch Wechselwirkungen mit der Gelmatrix retardiert und somit nach dem „Molekularsiebeffekt“ aufgetrennt werden (Eckert u. Kartenbeck, 1997).

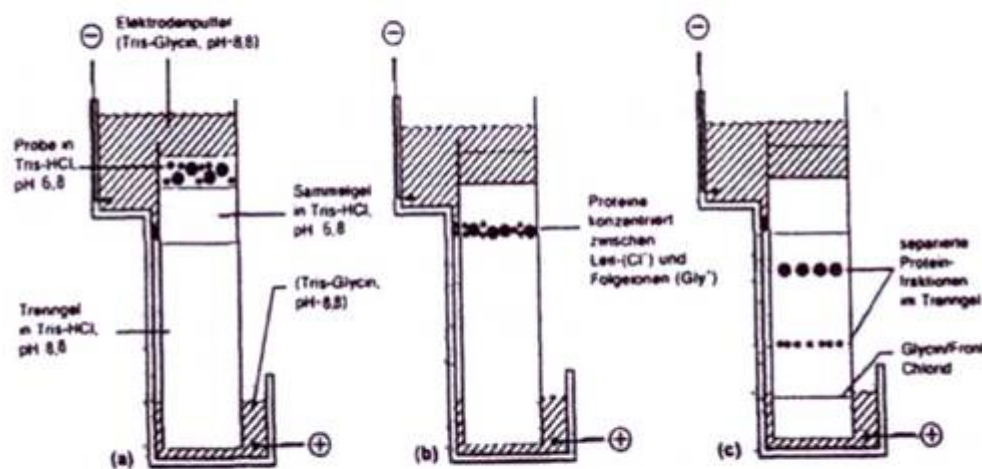


Abb. 3-7 Schematische Darstellung der Auftrennung von gelösten Proteinen durch SDS-PAGE. (a) die Testsubstanz inhomogener Molekülgröße, wird auf das Sammelgel aufgetragen. (b) Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proteine ins Sammelgel ein und konzentrieren sich an der Grenze zum Trenngel. (c) durch den „Molekularsiebeffekt“ kommt es im Trenngel zur Auftrennung der Proteine in Fraktionen gleichen Molekulargewichtes (Eckert W.A. und Kartenbeck J.; Proteine: Standardmethoden der Molekular- und zellbiologie. Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion, 1996, S.72)

Anschließend werden die durch die PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel möglichst vollständig auf eine synthetische Membran übertragen (*Western-Böttinger*), so dass ein Replikat der Gelelektrophorese entsteht. Die auf der Membran gebundenen Moleküle sind dann für einen immunologischen Nachweis mit Antikörpern (*Immunblotting*) zugänglich.

Beim *Tank-Blotting*-Verfahren befindet sich ein Schwamm-Gel-Membran-Schwamm-Sandwich zwischen vertikal angeordneten Plattenelektroden in einem Transfer-Puffer-Bad. Die Schwämme, Nitrocellulose-Membran und die Filterpapiere werden vorher mit Transfer-Puffer getränkt. Aufgrund der Geometrie sowie des geringen Elektrodenabstandes sind relativ starke und homogene elektrische Felder bei geringer Stromstärke und Leistung erreichbar, was die Transferzeit verkürzt und eine Systemkühlung überflüssig macht.

3.5.3 Vorbehandlung der Proteinproben

In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese mit dem *NuPAGE Elektrophoresis System* durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers (*Invitrogen*) vollzogen.

Die Proben (31-60 µg Gesamtprotein) wurden mit destilliertem Wasser auf 19,5, 26, 32,5 und 39 µl ergänzt und mit Reducing Agent und Loading Buffer (4x), wie in Tabelle 3-2 beschrieben, versetzt. Die Proteinproben wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Probenvolumen	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl
Protein + H ₂ O	19,5	26	32,5	39
<i>Reducing Agent</i>	3	4	5	6
<i>Loading Buffer 4x</i>	7,5	10	12,5	15

3.5.4 Beladen des Gels und Elektrophorese

Für die Gelelektrophorese werden 4-12% Gradientengele der Firma *Invitrogen* verwendet. Je nach Probenvolumen wurden die Gele der Stärke 1 mm (max. Beladung 40 µl) oder 1,5 mm (max. Beladung 60 µl) verwendet. Die Gel-Kassetten wurden in die *NuPAGE*-Kammer eingesteckt und die Kammer wurde mit 1x-*Running-Buffer* aufgefüllt bis die Geltaschen vollständig gefüllt waren. Anschließend wurden die Proteinproben mit einer Mikropipette mit

aufgesteckter Kapillarspitze vorsichtig eingefüllt. Durch das Glycin im *Loading Buffer* wird in den Proben eine größere Dichte erreicht, wodurch sie auf dem Boden der Taschen blieben.

Zusammensetzung des 1x-*Running-Buffers*:

Dest. H ₂ O	950 ml
10x- <i>Running-Buffer</i> (Invitrogen)	50 ml

Zur Elektrophorese wurde die Elektrode der unteren Puffer-Kammer an den positiven Pol des Netzgerätes angeschlossen, die obere Puffer-Kammer an den negativen Pol. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke, wobei sich die anzulegende Stromstärke nach Gelbreite und-dicke richtete. Meist wurden konstant 70 mA angelegt, bei einer Laufzeit von ca. 1 ¾ Stunden.

3.5.5 *Western-Blotting*: Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die Gelkassette aus der Gelkammer entfernt und mit einem Spatel aufgehebelt. Das Sammelgel wurde mit einem Skalpell entfernt, das Trenngel zurechgeschnitten und in 1x-*Transfer-Buffer* mit 10 % Methanol gelegt. Zwei Streifen Filterpapier und ein Streifen Nitrocellulose-Membran in der Größe des Gels wurden ebenfalls in 1x *Transfer-Buffer* mit 10 % Methanol eingelegt. Der Zusatz von Methanol soll die Bindungseffizienz der Proteine an die Membran erhöhen.

Der Transfer wurde schließlich in einem *Tank-Blotting*-Modul (Invitrogen) durchgeführt. Auf die Anode der *Blotting*-Apparatur wurden nun zwei mit *Transfer-Buffer* getränkte Schwämme und darauf ein getränktes Filterpapier gelegt. Danach folgten Nitrocellulose-Membran, Gel und wiederum ein Filterpapier und zwei getränkte Schwämme. Über das entstandene Sandwich wird die Kathode der *Blotting*-Apparatur angebracht (Abb. 3-8). Schließlich wurde über 1h ein konstanter Stromfluss von 10 mA angelegt. Nach Beenden des Blottings wurde die Membran aus dem *Sandwich* entfernt und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in 5% BSA (in Waschpuffer gelöst) gelegt. Das im Waschpuffer befindliche *Tween 20* diente als Detergens.



Abb. 3-8 Querschnitt: Aufbau des Filter-Membran-Sandwich in einem Tank-Blotting-Modul (Eckert W.A. und Kartenbeck J.; Proteine: Standardmethoden der Molekular- und zellbiologie. Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion, 1996, S.145)

Zusammensetzung des 1x *Transfer-Buffer*:

Dest. H ₂ O	850 ml
Methanol (98%)	100 ml
10x <i>Transfer-Buffer</i> (Invitrogen)	50 ml

Zusammensetzung des Waschpuffers:

Dest. H ₂ O	1420 ml
Tris 0,5M	40 ml
NaCl	40 ml
Tween 20	2 ml

3.5.6 Ponceau S-Färbung und *Immunoblotting*

Der saure Azofarbstoff Ponceau S diente zur visuellen Kontrolle des Transfers. Die Färbung ist reversibel und stört demzufolge den nachfolgenden immunchemischen Nachweis nicht. Von Nachteil ist die geringe Empfindlichkeit (Nachweisgrenze bei 250 ng/Proteinbande, Eckert und Kartenbeck, 1996). Nach erfolgter Färbung wurde die Nitrocellulose-Membran mit Waschpuffer bis zur Farblosigkeit gewaschen und in 5 % BSA (in Waschpuffer gelöst) über Nacht bei 4°C blockiert. Im Anschluss konnte ein Nachweis des membrangebundenen Proteins mit Antikörpern durchgeführt werden (*Immunoblotting*). Der monoklonale Primärantikörper wurde in 5 % BSA (in Waschpuffer gelöst) verdünnt (anti-FAK-AK 1:670). In dieser verdünnten Antikörperlösung wurde die Nitrocellulose-Membran 1h bei Raumtemperatur bewegt. Danach wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Membran 1h lang mit Waschpuffer gewaschen, wobei dieser alle 10 min durch frischen ersetzt wurde. Der Sekundärantikörper (anti-Kaninchen oder anti-Maus, *horseadish peroxidase* gekoppelt) wurde 1:5000 in 5 % BSA (in Waschpuffer gelöst) verdünnt. Wie beim Primärantikörper folgte eine einstündige Inkubation der Nitrocellulose-Membran. Im Anschluss daran wurde die Membran 1h lang gewaschen.

3.5.7 Proteindetektion durch Chemielumineszenz

3.5.7.1 Allgemeines

Zum Nachweis der Peroxidase, und damit des Membran-gebundenen Proteins wird im ECL-System Luminol (3-Aminophthalhydrazid) eingesetzt (Abb. 3-9). Es wird bei der Peroxidase-katalysierten Umsetzung von H_2O_2 unter alkalischen Bedingungen über mehrere Zwischenstufen und unter N_2 -Abspaltung zu einem kurzlebigen, energiereichen zyklischen Peroxid oxidiert. Das Peroxid zerfällt unter Abspaltung der Peroxid-Bindung in ein 3-Aminophthalat-Dianion. Die beim Zerfall freiwerdende Energie (70 kcal/mol) führt zur Anregung einer der beiden entstehenden Carbonylverbindungen.

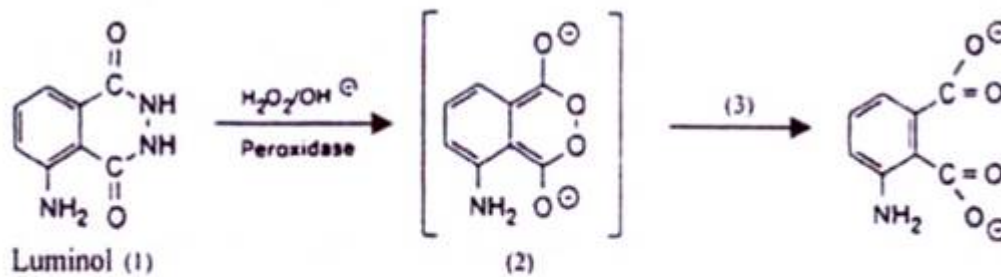


Abb. 3-19 Reaktionsverlauf im ECL-System (Eckert W.A. und Kartenbeck J.; Proteine: Standardmethoden der Molekular- und zellbiologie. Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion, 1996, S.193)

Das Spektrum des emittierten Lichtes (max. 428nm) liegt im Bereich der Sensitivität blauempfindlicher Standard-Röntgenfilme. Lichtausbeute und Chemielumineszenz werden im ECL-System durch Reaktion parasubstituierter Phenole mit den Enzymzwischenstufen bis über 1000fach verstärkt und auf einige Stunden verlängert. Wegen der hohen Empfindlichkeit dieser Nachweisreaktion ist eine optimale Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran unabdingbar. Ebenfalls störend wirken zu hohe Antigenkonzentrationen, zu gering verdünnte Antikörperlösungen und Antikörperlösungen ohne Blockierungssubstanzen (z.B. Tween 20). (Eckert und Kartenbeck, 1996).

3.5.7.2 Beschreibung der Technik

Substanz A (Ethanol) und Substanz B (Dioxan) des ECL- *Western blotting detection systems* wurden im Verhältnis 40:1 gemischt, so dass sich ein Endvolumen von mind. 0,1 ml/cm² Nitrocellulose-Membran ergab. Nach Abtropfen des überschüssigen Waschpuffers wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben in einer Schale mit ECL-Detektions-Gemisch 2min bei Raumtemperatur bewegt. Danach wurde die Membran mit einer Pinzette entnommen und überschüssige Flüssigkeit auf einer Küchenrolle abgestreift. Die feuchte Membran wurde mit der Proteinseite nach oben in eine Klarsichthülle gelegt und in einer Röntgenkassette mit

Klebestreifen fixiert. Bei Rotlicht wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt, wobei sich die Expositionsdauer nach der Signalintensität richtete (2 sec bis 2 min). Der Film wurde schließlich im Entwicklungsautomaten entwickelt.

3.5.8 *Stripping*

Nach erfolgter Immundetektion des Zielproteins konnte die Nitrocellulose-Membran für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden. Liegt das zweite Zielprotein auf ähnlicher Höhe, muss der an die Membran gebundene Antikörper der gegen das erste Zielprotein gerichtet ist, entfernt werden. Diesen Vorgang nennt man *Stripping* der Membran. Hierfür wurde die Membran für 3-5 min in einer milden *Stripping*-Lösung des *Western Blot Recycling Kits* (Chemicon) inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz in Waschpuffer geschwenkt und über Nacht bei 4°C in 5 % BSA (in Waschpuffer gelöst) blockiert. Danach konnte wie oben beschrieben ein zweites Zielprotein auf der Membran nachgewiesen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Migrationsversuche mit einer von Fibroblasten induzierten dreidimensionalen Matrix

Fibroblasten können bei geeigneten Bedingungen eine Matrix ausbilden, die ihnen nicht nur als passive Stütze dient, sondern ein aktives Konstrukt darstellt, das den Zellen sowohl Halt bietet als auch als Leitstruktur für Zellmigration dient und die Zellkommunikation unterstützt (Cukiermann E et al., 2001). Auf diese Erkenntnisse aufbauend wurde in der vorangegangenen Promotion ein 3D-Matrixmodell entwickelt, das die Möglichkeit bietet, die Laborversuche wirklichkeitsnäher nachzustellen. Die verwendeten Myofibroblasten wurden aus Biopsien oder Darmresektaten aus dem Colon gewonnen. Das Colon reicht von der Valva ileocaecalis bis zum Rectum und schließt Coecum, Pars ascendens, Pars transversa, Pars descendens und Sigma mit ein. Es wurden Myofibroblasten aus dem Colon (CLPF) von Patienten mit Morbus Crohn isoliert. Die Biopsien erfolgten aus drei verschiedenen Arealen, nämlich aus stenosierten (Stenose), fistulierten (Fistel) oder nur entzündlich veränderten Darmabschnitten (CD-CLPF). Letztere dienten als „Kontroll-Zellen“.

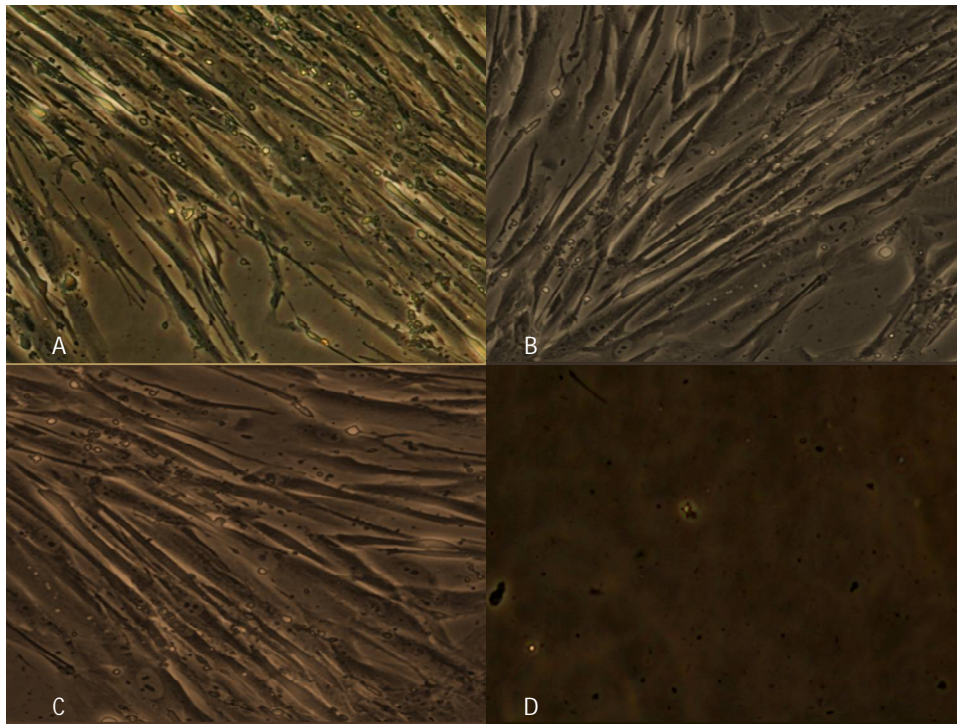


Abb. 4: CLPF-Zellkulturen von Morbus Crohn-Patienten aus drei verschiedenen Arealen: A aus fistulierten (Fistel), B aus stenosierten (Stenose) oder C nur entzündlich veränderten Darmabschnitten. D zeigt die von den CLPF synthetisierte Matrix vor der Beladung mit Zellen für die Migrationsassays. 400-fache Vergrößerung

Als größtes Problem erwies sich, auf dem Zellrasen eine scharf begrenzte Zelllyse zu erzeugen, wobei die Matrixstruktur und die umgebenden Zellen unangetastet bleiben sollten. Nach diversen monatelangen und frustrierenden Versuchsansätzen mit UV-Strahlung, die zwar Zelllyse erzeugte, sich aber durch die auftretende Streustrahlung schließlich als ungeeignet erwies, und einem Ansatz mit einer lokal applizierten zelllytisch wirkenden Substanz wie zum Beispiel Trypsin, bei der das Problem der Abdichtung nicht behoben werden konnte, und es so immer zu großflächigen Läsionen des Zellrasens kam, erwies sich nach dreimonatiger erfolgloser Experimentierzeit mit anderen Methoden ein Laserverfahren für eine lokal begrenzte Lyse als am besten geeignet. Wir fanden heraus, dass sich als optimales Laserverfahren die Bestrahlung des Zell-Matrix-Verbundes mit einem ErbiumYag-Laser zeigte, der eine wirksame Zelllyse erzeugte und keinerlei Nekrosesaum hinterließ. Außerdem führt er bei Fibroblasten zu keinerlei morphologischen Veränderungen (Rossa CJ et al., 2002).

Nachdem die Zellen über sechs Tage ihre Extrazellulärmatrix auf einem 2-well-chamber-slide gebildet hatten, wurden sie mit 200mJ und 1Hz mittels Erbium:YAG-Laser bestrahlt. Unmittelbar im Anschluss daran wurde das alte Medium durch ein CO₂-unabhängiges Medium mit Zusatz von 1µl Mitomycin pro ml Medium ersetzt, um eine Proliferation während des Beobachtungszeitraumes auszuschließen. Danach wurde der 2-well-chamber-slide sofort in die Beobachtungsvorrichtung (im Brutraum befindliches Mikroskop mit angeflanschter Digitalkamera) eingebracht und fixiert. Daraufhin erfolgte alle 4h eine digitale Aufnahme und alle 8h wurde das CO₂-unabhängige Medium erneuert; die gewonnenen Daten lieferten folgende Ergebnisse.

4.1.1 Quantitative Auswertung

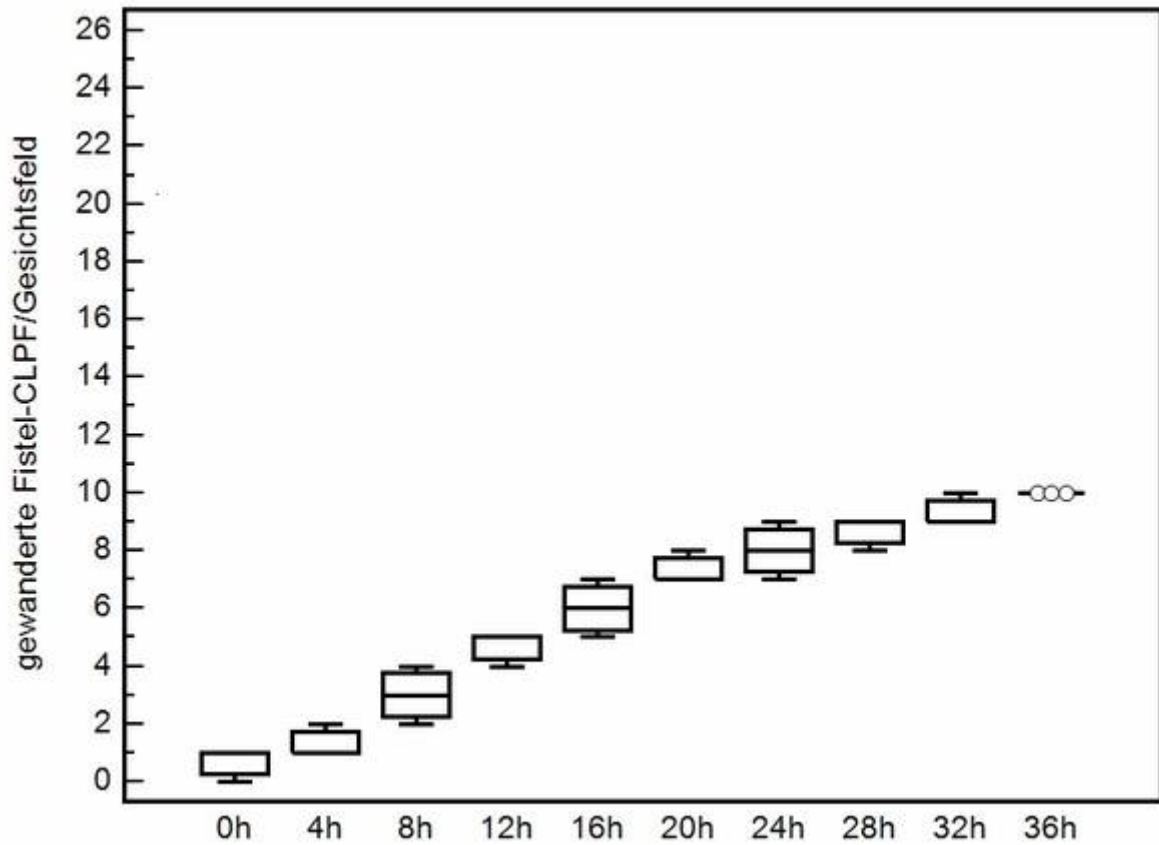


Abb. 4-1 Anzahl der in den Lysebereich migrierten Zellen aus fistulierten Darmschleimhautarealen bei CD-Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 36 Stunden: es zeigt sich ein konstanter Anstieg ohne positive oder negative Ausbrüche bis zum Endpunkt der Untersuchung bei 36 Stunden. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes liegt mit 10 ± 2 CLPF/Gesichtsfeld ($p=0,10$) die Anzahl der gewanderten CLPF pro Zeiteinheit deutlich unter der Referenz (CD-CLPF).

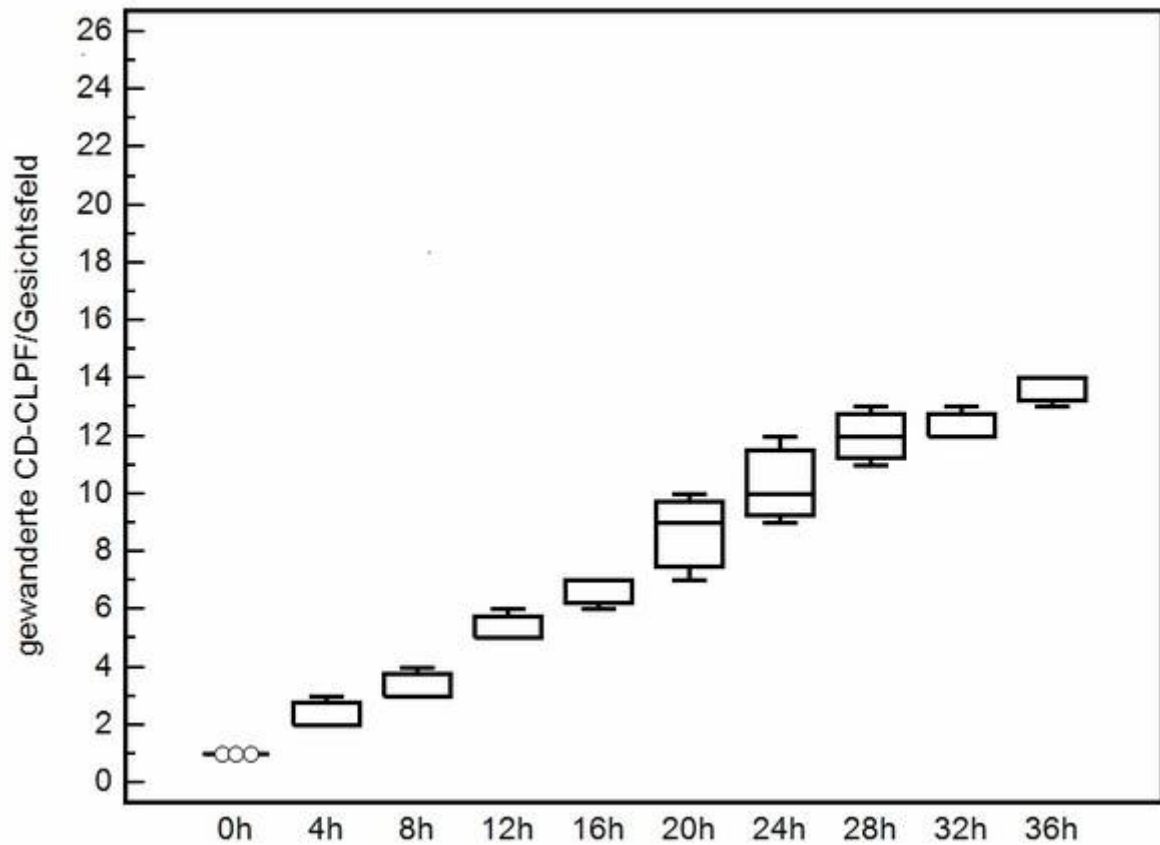


Abb. 4-2 Anzahl der in den Lysebereich migrierten Zellen aus rein entzündlich veränderten Darmschleimhautarealen bei CD-Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 36 Stunden: es zeigt sich ein konstanter Anstieg ohne negative oder positive Ausbrüche bis zum Endpunkt der Untersuchung bei 36 Stunden mit 14 ± 3 CLPF/Gesichtsfeld.

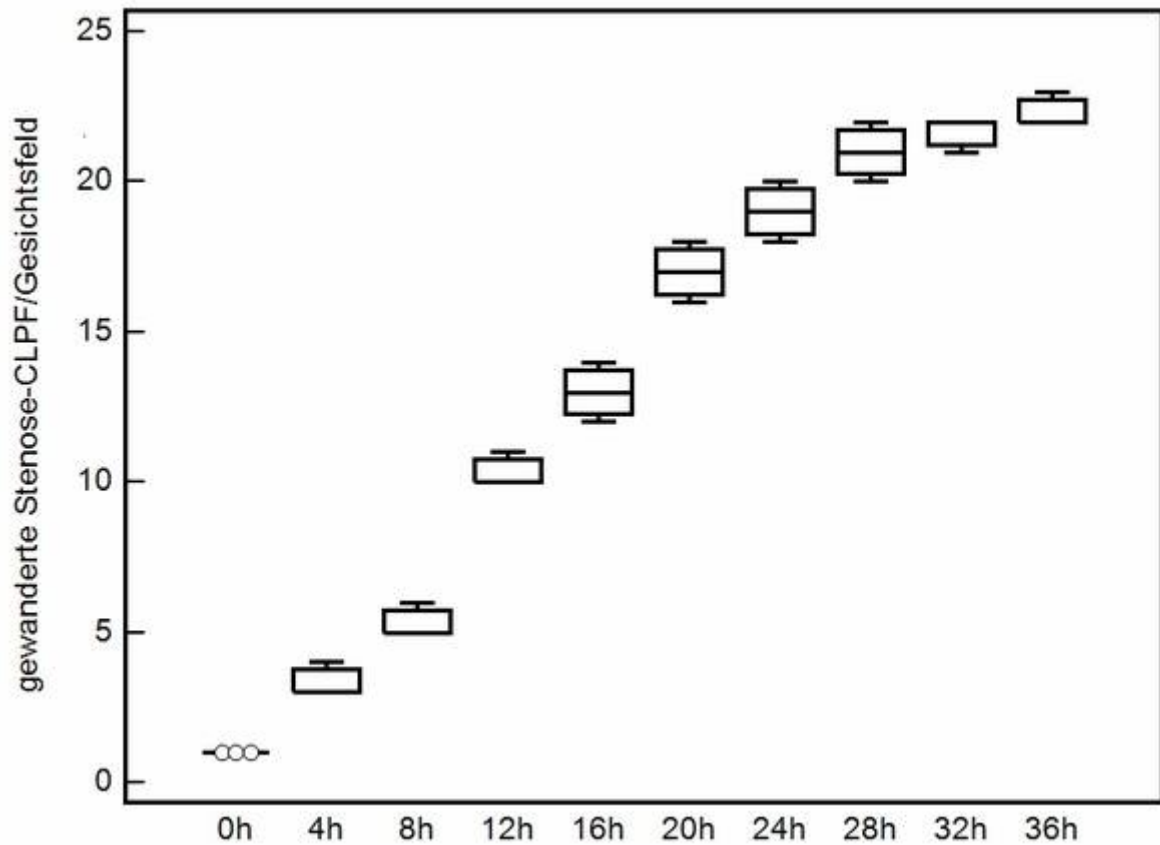


Abb. 4-3 Anzahl der in den Lysebereich migrierten Zellen aus stenosierte Darm Schleimhautarealen bei CD-Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 36 Stunden: es zeigt sich ein inkonstanter Anstieg mit positiven Ausbrüchen, vor allem nach 8 Stunden und leichter Abflachung nach 20 Stunden des Beobachtungszeitraums. Während der gesamten Zeit liegt die Anzahl der gewanderten CLPF pro Zeiteinheit signifikant über der Referenz (CD-CLPF). Zum Untersuchungsendpunkt bei 36 Stunden waren 22 ± 3 CLPF/Gesichtsfeld ($p < 0,005$) in den Lysebereich gewandert.

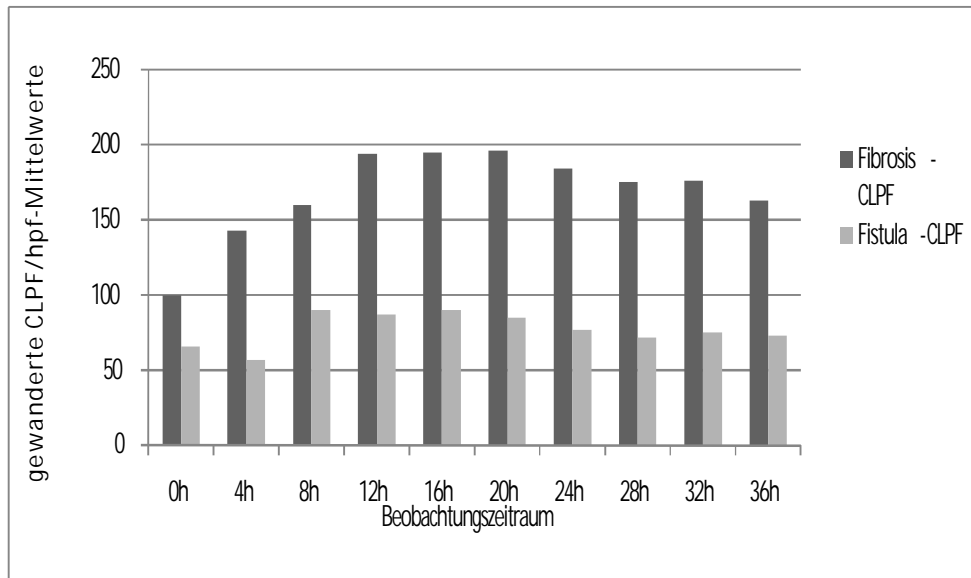


Abb. 4-4 Mittelwerte des zeitlichen Verlaufs der Migration von Myofibroblasten aus stenosierte und fistulierten Arealen in den Lysebereich innerhalb von 36 Stunden bezogen auf die Fibroblasten aus entzündeter Darmwand: es wird deutlich, dass die Zellen aus den stenosierte Arealen während des ganzen Beobachtungszeitraumes von 36h die MC-CLPF aus entzündeter Mucosa in ihrem Migrationspotential deutlich übertreffen. Dies wird bereits nach 4 Stunden ersichtlich, wenn die Zellen aus den stenosierte Bereichen die CD-CLPF aus entzündeter Mucosa um den Faktor 1,4 im Migrationspotential überragen. Im Zeitraum zwischen 12 und 20 Stunden erreicht das Migrationspotential der Zellen aus stenosierte Bereichen sogar beinahe den doppelten Wert (Faktor 1,9) der Referenz. Das Migrationspotential der Zellen aus den fistulierten Bereichen liegt vor allem zu Beginn der Untersuchung mit 57 % signifikant unter dem Migrationspotential der CD-CLPF und bleibt während des gesamten Zeitintervalls von 36 Stunden deutlich unter der Referenz.

Bei den digitalen mikroskopischen Aufnahmen im Brutraum (37°C und 10% CO₂) zeigten sich teils signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten der drei untersuchten Populationen, wobei die Ergebnisse der Vorversuche (im Rahmen der humanmedizinischen Dissertation) mit der modifizierten Boydenkammer bestätigt wurden. Die Fibroblasten aus fistulierten Arealen wiesen mit 10 ± 0 ($p=0,1$) gewanderten CLPF nach 36h/Bild (Abb. 4-1) eine reduzierte Migration im Vergleich zu denen aus entzündeter Mucosa auf, bei denen 14 ± 1 CD-CLPF nach 36h/Bild gewandert waren (Abb 4-2). Die Stenosefibroblasten wanderten mit 22 ± 1 CLPF nach 36h/Bild signifikant ($p<0,005$) stärker als die CD-CLPF aus entzündeter Mucosa (Abb. 4-3).

Durch die Aufnahme einer Bildersequenz über 36 Stunden war es außerdem möglich, eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Migration zu machen (Abb.4-4). Es zeigte sich, dass die Zellen aus den Stenosearealen gleich von Beginn an massiv (nach 4 Stunden 140% Migration der CD-CLPF) dazu tendierten, in den Gewebedefekt einzuwandern. Dieser Effekt hielt dann auch die ersten 20 Stunden an (190% Migration der CD-CLPF), fiel dann stetig ab, wobei die Werte mit 160 % nach 36 Stunden zu jeder Zeit deutlich über denen der CD-CLPF lagen. Bei den Fibroblasten aus fistulierten Bereichen zeigte sich ein genau entgegengesetztes Bild. Schon zu Beginn des Beobachtungsintervalls von 36h lag das Migrationspotential unter dem Niveau der CD-CLPF (nach 4h 60% Migration der CD-CLPF). Im Zeitraum von der 8. bis zur 20. Stunde erreichten die Fistel-CLPF mit 90 % beinahe das Migrationspotential der Referenz, um aber danach wieder auf Werte deutlich unter 75 % abzufallen.

Dies bestätigte wiederum die Ergebnisse der humanmedizinischen Vorversuche mit der modifizierten Boydenkammer und machte deutlich, dass Fibroblasten aus stenosierten Arealen ein signifikant erhöhtes Migrationspotential im Vergleich zu den CD-CLPF aus entzündeter Mucosa aufweisen, wobei diese wiederum die Fibroblasten aus fistulierten Arealen hinsichtlich ihres Migrationspotentials deutlich übertreffen.

Dieses stark differierende Migrationsverhalten lässt die drei untersuchten Populationen als unterschiedliche Phänotypen erscheinen.

4.1.2 Qualitative Beobachtung und Beschreibung des Migrationsverhaltens

4.1.2.1 Beobachtungen während und nach der Migration der Fibroblasten aus entzündeter Mucosa (CD-CLPF)

Die MC-CLPF zeigten eine rege Tendenz den mittels Laserstrahl erzeugten Defekt zu verschließen; dies geschah vornehmlich durch die Ausstülpung von Lamellipodien, die auf der Suche nach neuen Zellkontakten in das verletzte Areal einwanderten. Während ihrer Migration legten die CD-CLPF die Distanz ihrer eigenen Ausgangszelllänge zurück und schafften es schließlich, nach 36 Stunden durch zirkuläres Einwachsen den zylinderförmigen Defekt zu 75% zu verschließen. Man kann davon ausgehen, dass die CD-CLPF in der Lage gewesen wären, selbst bei gestoppter Proliferation durch Mitomycin den Gewebedefekt nach

spätestens 52 Stunden zu verschließen. Dies stellte eine Leistung dar, die beim Vergleich mit den anderen beiden Zellreihen als Referenzmarke betrachtet wurde (Abb. 4-5).

4.1.2.2 Beobachtungen während und nach der Migration der Stenosefibroblasten

Die Migration der Zellen aus den stenosierte Arealen zeigte ein massives Bestreben der Zellen, den Gewebedefekt möglichst schnell zu reparieren (nach 4h 140% Migration der CD-CLPF). Die Zellen bewegten sich formationsartig auf die Läsion zu, wobei sie ständig Zell-Zell-Kontakt hatten. So schafften es die Stenosezellen, trotz mittels Mitomycin gestoppter Proliferation, Ausläufer zu bilden und innerhalb relativ kurzer Zeit in die Wunde einzuwandern (nach 12h 190 % Migration der Referenz) und auf diese Weise den Defekt nach 36h vollkommen zu decken (nach 36h 160 % Migration der CD-CLPF). Betrachtet man die Strecke, die die Zellen dabei zurücklegten, dann kann man feststellen, dass die Stenosezellen während der 36 Stunden eine Distanz bewältigten, die dem Doppelten ihrer Ausgangszelllänge entspricht. Außerdem ist zu erwarten, dass es bei erhaltener Proliferation zu einem wucherungshaften Verschluss des Defektes kommen würde. Dieses *in vitro* beobachtete Verhalten ist ähnlich den Verhältnissen *in vivo* bei der Entstehung von Darmstrikturen, die bekanntermaßen bis zum vollständigen Verschluss des Darmlumens führen können. Außerdem bestätigten die hier gemachten Untersuchungen das massiv gesteigerte Migrationsverhalten der Stenosezellen in der modifizierten Boydenkammer (Abb. 4-5) im Rahmen der humanmedizinischen Dissertation).

4.1.2.3 Beobachtungen während und nach der Migration von Fibroblasten aus fistulierten Darmarealen

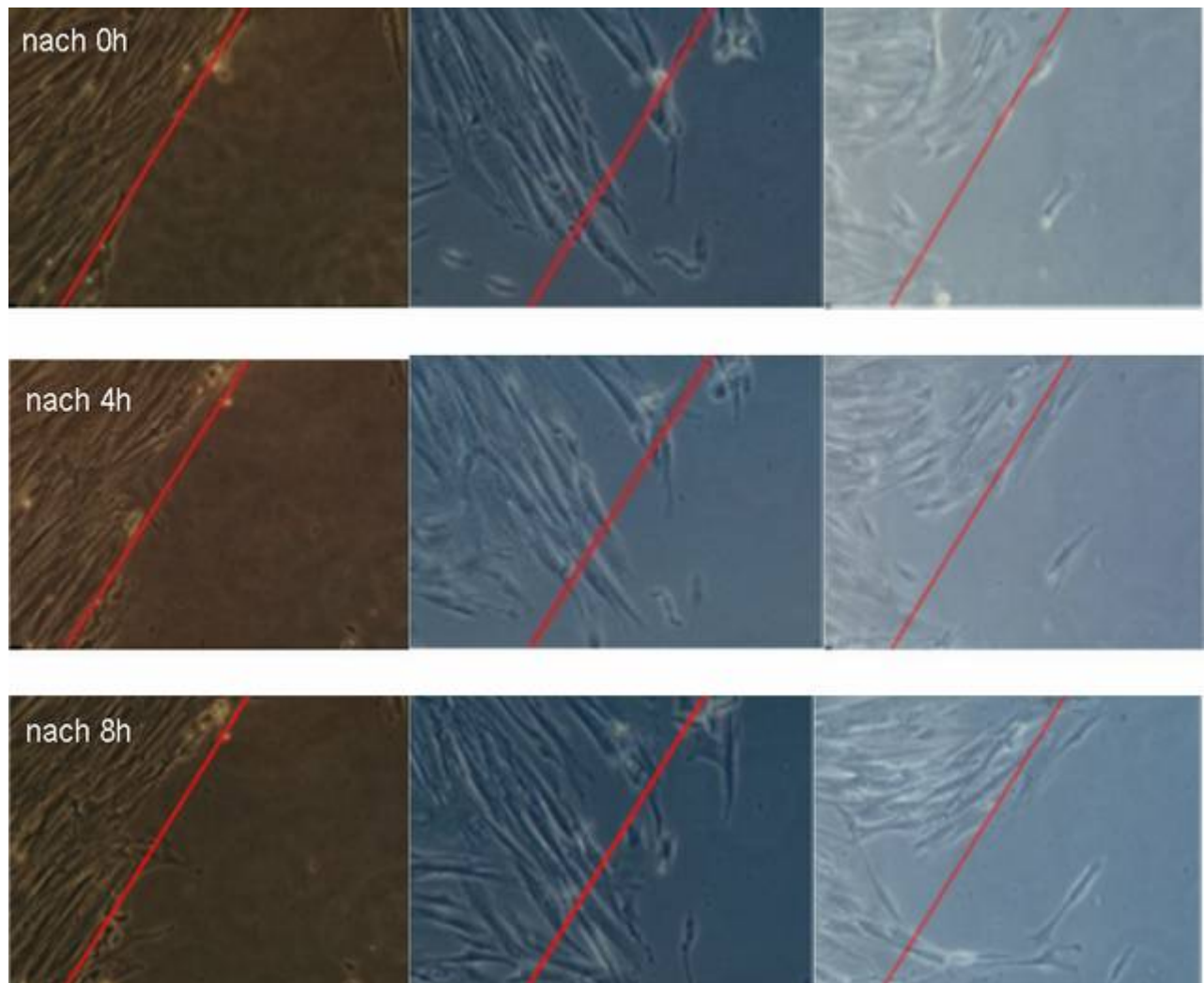
Bei Zellen aus fistulierten Arealen wurde vor allem deutlich, dass die Zellen relativ träge migrierten und keine große Tendenz zeigten, den erzeugten Defekt so schnell wie möglich wieder zu verschließen. Viel mehr bildeten sie kleinste Ausläufer und dehnten sich entlang

ihrer Längsachse aus, ohne aber - im direkten Vergleich zu den anderen Zellreihen - untereinander einen intensiven Zell-Zell-Kontakt herstellen zu können; folglich war der Defekt im Zellverbund auch nach 36 Stunden Migration (70% Migration der CD-CLPF) beinahe genauso groß wie direkt nach der Zellyse bei 0 Stunden. Es ist davon auszugehen, dass (wenn überhaupt) diese Läsion erst nach mehr als 72 Stunden verschlossen gewesen wäre. Die Wundheilung *in vitro* war also massiv reduziert, was den Verhältnissen *in vivo* entspricht. Dies bestätigte ebenfalls die Ergebnisse der Voruntersuchungen mit der Boydenkammer (Abb. 4-5).

**CD-CLPF aus
entzündeter Mucosa**

**Myofibroblasten aus
stenosierten Arealen**

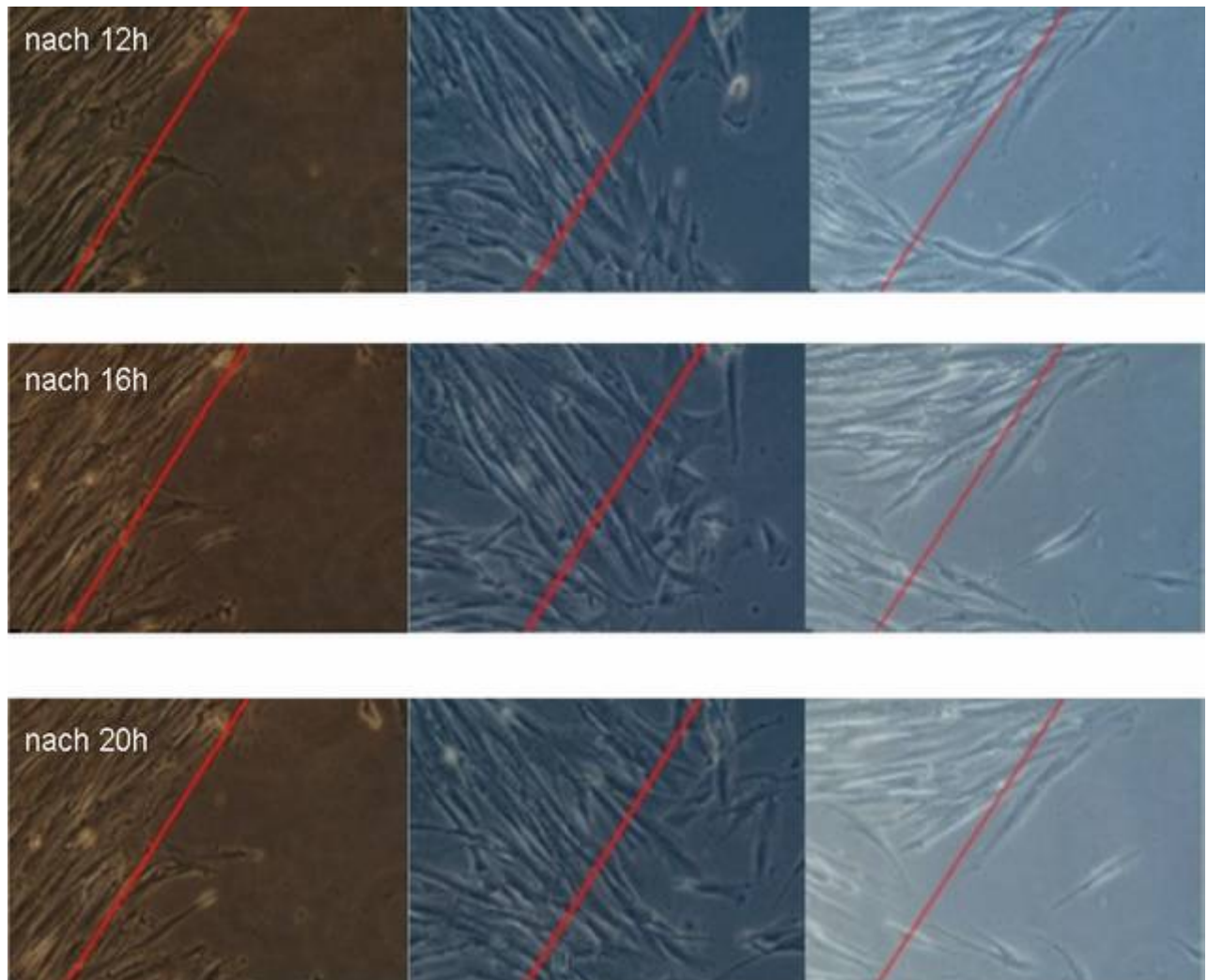
**Myofibroblasten aus
fistulierten Arealen**



**CD-CLPF aus
entzündeter Mucosa**

**Myofibroblasten aus
stenosierten Arealen**

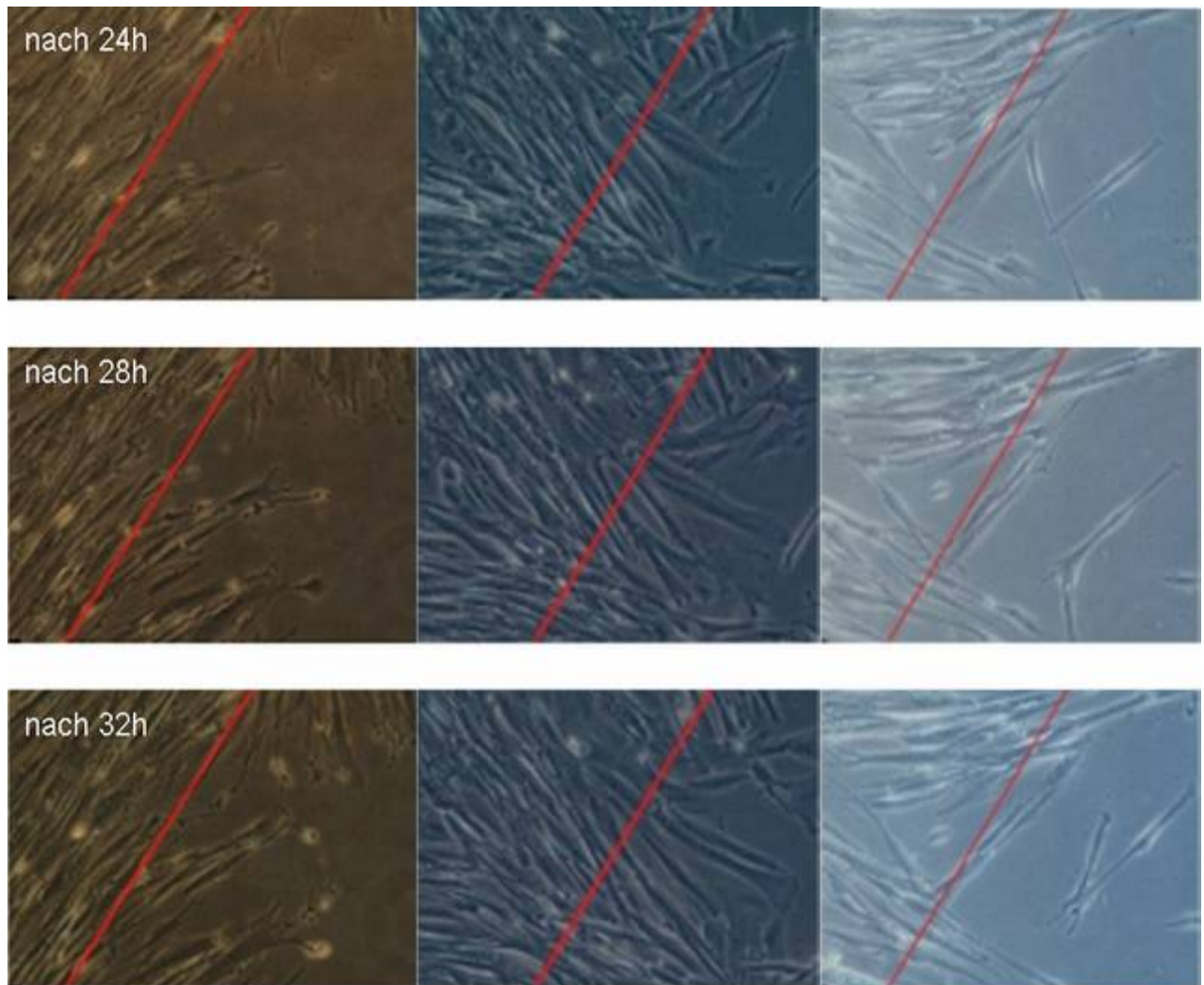
**Myofibroblasten aus
fistulierten Arealen**



**CD-CLPF aus
entzündeter Mucosa**

**Myofibroblasten aus
stenosierten Arealen**

**Myofibroblasten aus
fistulierten Arealen**



**CD-CLPF aus
entzündeter Mucosa**

**Myofibroblasten aus
stenosierten Arealen**

**Myofibroblasten aus
fistulierten Arealen**



Abb. 4-5 Mikroskopische Bildersequenz 0-36 Stunden; 400-fache Vergrößerung

4.2 Die unterschiedlichen Migrationspotentiale von Myofibroblasten aus entzündeter, fistulierter und stenosierter Darmschleimhaut gehen mit einer unterschiedlichen Expression der Focal Adhesion Kinase (FAK) einher.

Als entscheidender Faktor bei der Zellmigration wird die dynamische adhäsive Wechselwirkung zwischen Integrinen der Zelle einerseits und der Extrazellulärmatrix andererseits gesehen. Fokale Adhäsionen entstehen hierbei durch Integrin-Rezeptor-Beteiligung und Cluster-Bildungen. Die phosphorylierte *fokale adhesion kinase* (FAK) ist in diesen fokalen Adhäsionen zu finden. Die Phosphorylierung der rezeptorfreen 125 kDa Tyrosinkinase FAK ist von diversen Stimuli abhängig und spielt bei der Signalübermittlung zwischen Zelloberflächenrezeptoren und Aktinzytoskelett eine wichtige Rolle. In den durchgeführten Versuchen soll deshalb die Expression der FAK zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung eines konfluenten Zellrasens von Myofibroblasten aus entzündeten, fistulierten und stenosierten Darmarealen untersucht werden.

4.2.1 Regulation der FAK in Myofibroblasten aus entzündeten, fistulierten und stenosierten Darmarealen nach Verwundung

Zu den Zeitpunkten 4h und 8h nach Verwundung eines konfluenten Zellmonolayers und damit verbundener Migrationsinduktion wurde mittels Western Blot die jeweilige Expression von FAK überprüft. Als Kontrolle fanden jeweils Myofibroblasten aus unverwundeten Zellmonolayern (0h-Zeitpunkt) Verwendung. In die Untersuchung waren Myofibroblasten von jeweils 3 Morbus Crohn-Patienten mit fistulierter, stenosierter oder rein entzündlich veränderter Darmschleimhaut eingeschlossen.

In Abbildung 4-6 sind exemplarisch die Ergebnisse der Gelelektrophorese von Myofibroblasten jeweils eines Morbus Crohn-Patienten mit stenosierendem (Stenose-CLPF), fistulierendem (Fistel-CLPF) oder rein entzündlichem Verlauf (CD-CLPF) zusammengefasst.

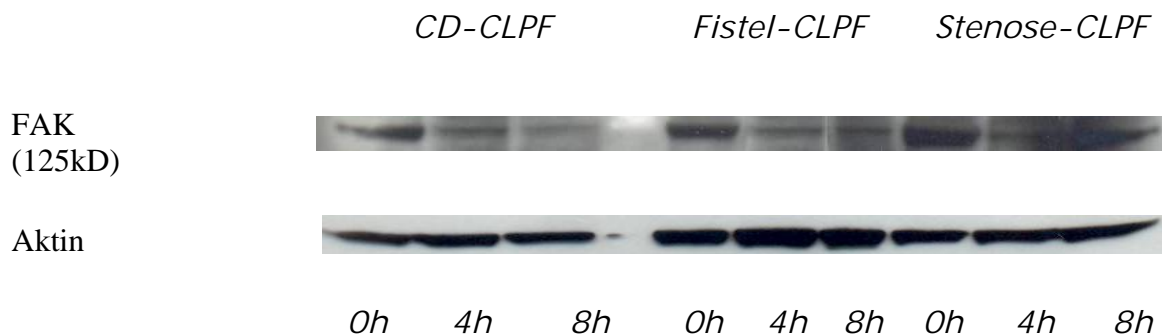


Abb 4-6 Western Blot: Regulation von FAK zum Zeitpunkt vor der Verwundung (0h) sowie 4 bzw 8h nach der Verwundung des konfluenten Zellrasen von entzündeten Arealen (CD-CLPF) sowie von Stenosen (Stenose-CLPF) und Fisteln (Fistel-CLPF). Beladungskontrolle mit house keeping protein Aktin

Die Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet, die erhaltenen Werte auf das house keeping protein Aktin bezogen und schließlich relativ zum 0h-Zeitpunkt graphisch dargestellt. In den CD-CLPF nahm die Expression von FAK 4h nach Verwundung bezogen zum 0h-Zeitpunkt um $20 \pm 5 \%$ ab. Nach 8h war die FAK-Expression bereits um $30 \pm 5 \%$ reduziert. Diese Werte wurden als Referenz gewertet. Im Vergleich dazu zeigten die Fistel-CLPF 4h nach Verwundung mit $37 \pm 5 \%$ eine deutlich reduzierte FAK-Expression. Dieser Unterschied wurde 8h nach Verwundung noch deutlicher, wobei sich eine Reduktion der FAK-Expression um $60 \pm 10 \%$ ($p=0,08$) ergab. Die Stenose-CLPF hingegen zeigte im Vergleich zur Referenz mit Werten von $7 \pm 3 \%$ nach 4h und $5 \pm 2 \%$ nach 8h eine signifikante ($p=0,04$) Zunahme der FAK-Expression (Abb. 4-7). Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten aus den Migrationsuntersuchungen überein, wonach ein im Vergleich zur Referenz (CD-CLPF) reduziertes Migrationspotential der Fistel-CLPF mit einer reduzierten FAK-Expression einhergeht. Die gesteigerte FAK-Expression bei Stenose-CLPF spiegelt sich in einer erhöhten Migrationsleistung wieder.

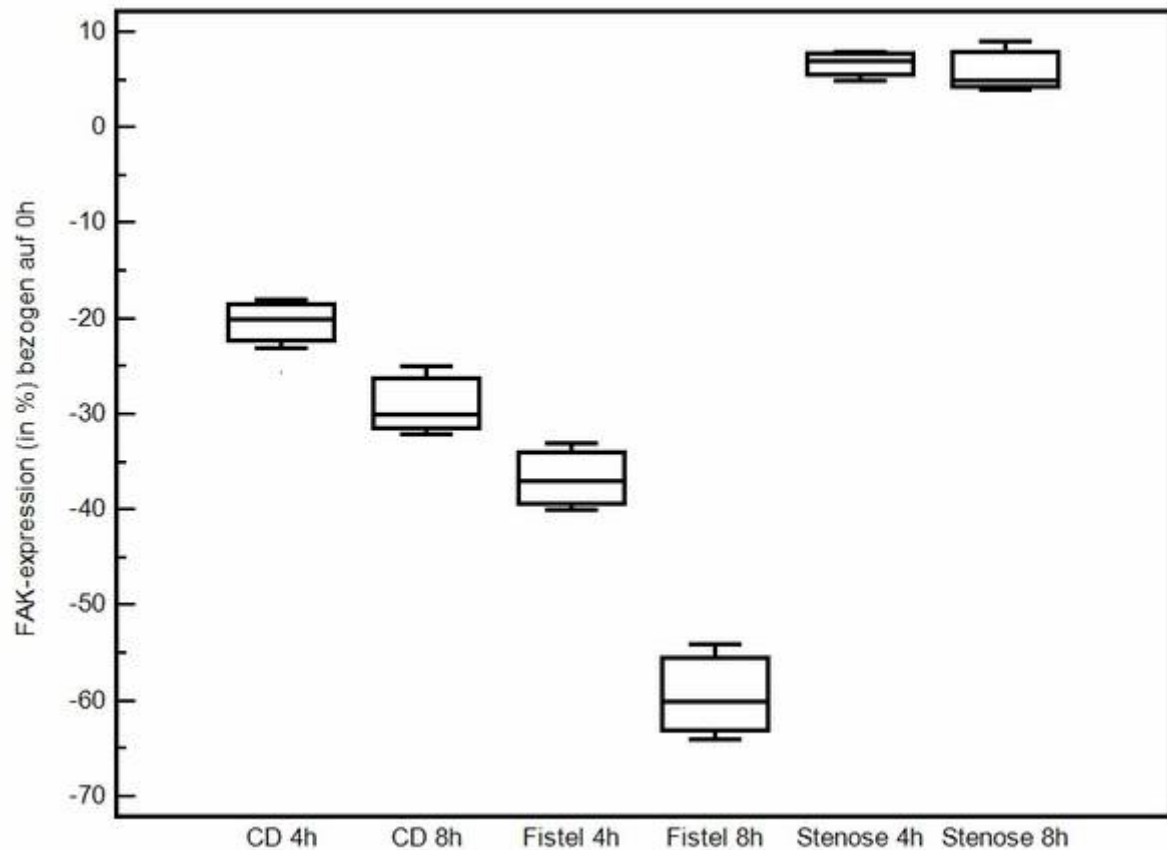


Abb. 4-7 Densitometrische Auswertung der Gelelektrophoreseergebnisse von FAK, 4h und 8h nach Verwundung eines konfluenten Zellmonolayers von CLPF. Als Kontrolle dienten jeweils CLPF eines unverwundeten Zellrasens (0h). In die Untersuchung waren Myofibroblasten von jeweils 3 Morbus Crohn-Patienten mit fistulierter, stenosierter oder rein entzündlich veränderter Darmschleimhaut eingeschlossen. Alle Fehler sind Standardfehler.

4.2.2 Die Expression von FAK in Myofibroblasten aus entzündeten, fistulierten und stenosierten Darmarealen nach 3 Tagen Inkubation mit IFN- γ und TNF und anschließender 7-tägiger Normalkultur

In der vorangegangenen humanmedizinischen Dissertation konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von Myofibroblasten aus rein entzündlich veränderter Darmschleimhaut mit IFN- γ zu einer signifikanten Reduktion des Migrationspotentials führt. Eine Inkubation mit TNF hingegen zeigte keinerlei Effekt auf die Migrationsleistung. Nun soll untersucht werden, ob sich diese Ergebnisse auch in einer entsprechenden Reduktion der FAK-Expression widerspiegeln. Nach Verwundung von konfluenten Zellmonolayern und damit resultierender Migration wurde mittels Western Blot die jeweilige FAK-Expression untersucht. Es kamen

Myofibroblasten aus rein entzündlich veränderter (CD-CLPF), stenosierter oder fistulierter Darmschleimhaut von jeweils 3 Patienten, die 3 Tage mit IFN- γ (10 ng/ml) und TNF (20 ng/ml) inkubiert und anschließend für 7 Tage ohne Zytokinzugabe kultiviert wurden zur Anwendung. Exemplarisch sind in Abbildung 4-8 die Gelelektrophorese-Ergebnisse jeweils eines Patienten zusammengefasst.

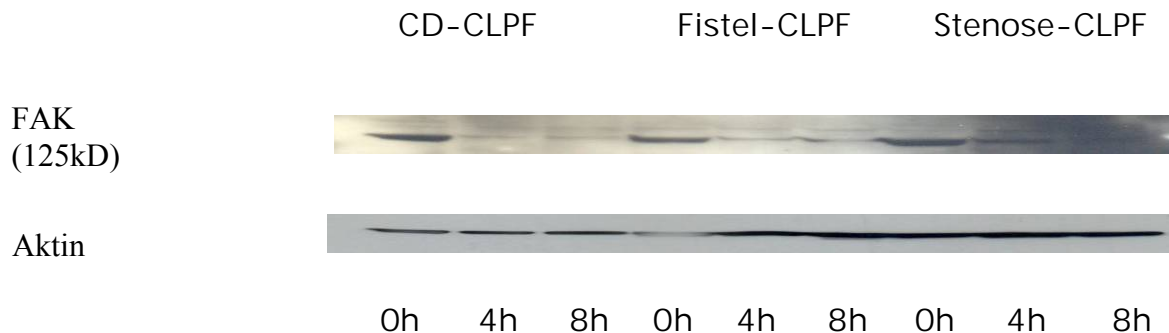


Abb 4-8 Western Blot: Regulation von FAK zum Zeitpunkt vor der Verwundung (0h) sowie 4 bzw 8h nach der Verwundung des konfluenten Zellrasen von entzündeten Arealen (CD-CLPF) sowie von Stenosen (Stenose-CLPF) und Fisteln (Fistel-CLPF) nach 3-tägiger Inkubation mit IFN- γ (10 ng/ml) und TNF (20 ng/ml) sowie konsekutiver Normalkultivierung für 7 Tage. Beladungskontrolle mit house keeping protein Aktin

Die Western Blots wurden wiederum densitometrisch ausgewertet, die erhaltenen Werte auf das house keeping protein Aktin bezogen und schließlich relativ zum 0h-Zeitpunkt graphisch dargestellt.

In den CD-CLPF nahm die Expression von FAK 4h nach Verwundung bezogen zum 0h-Zeitpunkt um $40 \pm 5 \%$ ab. Nach 8h war die FAK-Expression auf ähnlichem Niveau um $38 \pm 5 \%$ reduziert. Diese Werte wurden als Referenz gewertet. Die Fistel-CLPF zeigten, verglichen mit der Referenz, 4h nach Verwundung mit $50 \pm 5 \%$ eine deutlich reduzierte FAK-Expression. Dieser Unterschied wurde 8h nach Verwundung noch deutlicher wobei sich eine signifikante Reduktion ($p < 0,005$) der FAK-Expression um $64 \pm 10 \%$ ergab. Die Stenose-CLPF hingegen zeigte im Vergleich zur Referenz mit Werten von $20 \pm 5 \%$ nach 4h und $20 \pm 7 \%$ nach 8h eine signifikant ($p < 0,005$) geringere Reduktion der FAK-Expression (Abb. 4-9). Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten aus den Migrationsuntersuchungen überein, wonach die Inkubation mit IFN- γ und TNF zu einer Reduktion des Migrationsverhaltens aller 3 untersuchten Zelltypen führt. Ein im Vergleich zur Referenz (CD-CLPF) reduziertes Migrationspotential der Fistel-CLPF geht wiederum mit einer

reduzierten FAK-Expression einher. Die gesteigerte FAK-Expression bei Stenose-CLPF spiegelt sich in einer erhöhten Migrationsleistung wieder, wobei alle Werte der FAK-Expression deutlich unter denen ohne Inkubation liegen, was wiederum die vorangegangenen Boydenkammer-Versuche bestätigt.

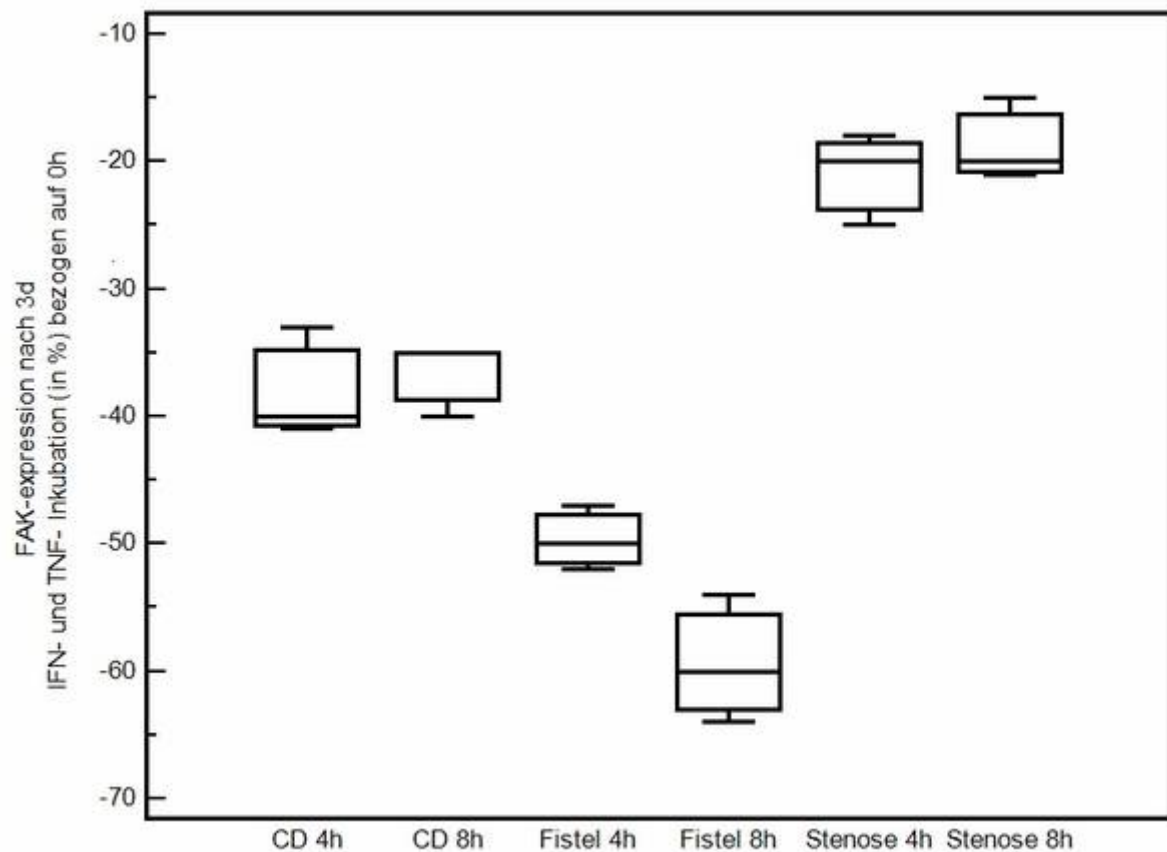


Abb. 4-7 Densitometrische Auswertung der Gelelektrophorese-Ergebnisse von FAK, 4h und 8h nach Verwundung eines konfluenten Zellmonolayers von CLPF. Als Kontrolle dienten jeweils CLPF eines unverwundeten Zellrasens (0h). In die Untersuchung waren Myofibroblasten von jeweils 3 Morbus Crohn-Patienten mit fistulierter, stenosierter oder rein entzündlich veränderter Darmschleimhaut nach 3-tägiger Inkubation mit IFN- γ (10 ng/ml) und TNF (20 ng/ml) sowie konsekutiver Normalkultivierung für 7 Tage eingeschlossen. Alle Fehler sind Standardfehler

5 Diskussion

5.1 Das Migrationsverhalten unterscheidet sich bei Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und entzündeten Darmarealen von Patienten mit Morbus Crohn im dreidimensionalen Migrationsmodell.

Wo auch immer am menschlichen Körper eine Verwundung auftritt, spielt für den Wundverschluss die Rekrutierung und die folgende Migration von Fibroblasten eine entscheidende Rolle; für eine optimale Reparatur von verletztem Gewebe ist dies unabdingbar (Postlethwaite AE et al., 1990). Die Mechanismen dieser Prozesse sind bislang noch nicht abschließend geklärt. Lediglich die Studie von Kernochan et al. identifizierte Endothelin-1 als eine bei Myofibroblasten migrationstimulierende Substanz (Kernochan LE et al., 2002). Bei humanen Hautfibroblasten konnte *in vitro* eine Migration beobachtet werden, die durch ein von den Zellen selbst konditioniertes Medium induziert wurde (Albini A et al., 1988; Heckmann M et al., 1993; Mensing H et al., 1983). Frau Dr. rer. nat. Sandra Leeb, ein ehemaliges Mitglied unserer Arbeitsgruppe, konnte zeigen, dass dieses Phänomen auch bei intestinalen Myofibroblasten zu beobachten ist, und dass die Extrazellulärmatrix-Komponente Fibronectin hierfür ursächlich ist (Leeb S et al. 2004). Aus der Literatur war bis dahin bekannt, dass Fibronectin die Migration von Fibroblasten stimulieren kann (Dean JW et al., 1997; Gauss-Müller V et al., 1980; Grotendorst GR, 1984; Kawamoto M et al., 1997; Maheshwari G et al., 1999; Schor SL et al., 1996).

Des Weiteren konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass Myofibroblasten autokrin Fibronectin, das prinzipiell eine gerichtete Bewegung aus unversehrtem Gewebe in defekte Areale bewirken kann, produzieren. Dies ist eine Grundvoraussetzung dafür, dass ein Wunddefekt schnell und effektiv verschlossen werden kann. Außerdem konnte S. Leeb nachweisen, dass intestinale Myofibroblasten von Morbus Crohn-Patienten ein deutlich reduziertes Migrationspotential im Vergleich zu Kontrollfibroblasten zeigen; dies ließ vermuten, dass Morbus Crohn-Myofibroblasten einen anderen Phänotyp darstellen als Kontrollfibroblasten aus nicht-entzündeten Darmabschnitten von gesunden Patienten.

Unverstanden war aber nach wie vor, weshalb es bei Morbus Crohn bei der einen Patientengruppe zu einem fistulierenden Verlauf kommt, während bei der anderen Gruppe Stenosen oder entzündliche Verläufe zu beobachten sind. Dies gab dazu Anlass, diese drei Gruppen genauer zu untersuchen um eventuelle phänotypische Unterschiede aufzudecken.

In Migrations-Assays mit der modifizierten Boydenkammer konnte im Rahmen der humanmedizinischen Dissertation gezeigt werden, dass sich die intestinalen Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und entzündeten Arealen hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens signifikant voneinander unterscheiden. Die Myofibroblasten aus stenosierten Darmarealen migrierten signifikant stärker als Myofibroblasten aus rein entzündlich veränderten Bereichen. Die Myofibroblasten aus fistulierenden Arealen hingegen zeigten, verglichen mit der Referenz, ein signifikant reduziertes Migrationspotential. Auch nach Erzeugung eines künstlichen Entzündungsmileus durch TNF und IFN- γ Inkubation für 7 Tage konnten die signifikant differierenden Migrationspotentiale auf einem insgesamt niedrigeren Migrationsniveau bestätigt werden. Dieses Phänomen war sowohl auf Medien von Stenosen als auch auf Medien von Fisteln und entzündeter Mucosa zu beobachten. Während das relative Migrationsverhalten zwischen den drei konditionierten Medien beinahe identisch war, unterschieden sich die Absolutzahlen der migrierten Zellen doch deutlich: auf konditioniertem Medium von Morbus Crohn-Fibroblasten aus entzündeter Mucosa migrierten insgesamt mehr Zellen als auf konditioniertem Medium von Myofibroblasten aus fistulierten Darmabschnitten. Dies lässt vermuten, dass Zellen aus entzündeter nicht fistulierter oder stenosierter Darmmukosa mehr migrationsinduzierendes Fibronectin produzierten als die Myofibroblasten aus den fistulierten Arealen. Diese Beobachtungen deckten sich mit den darauf durchgeführten Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe, wonach in Morbus-Crohn-Mukosa aus entzündlich veränderten Arealen die migrationinduzierenden Fibronectinisoformen ED-A und ED-B im Vergleich zu gesunder Darmschleimhaut deutlich reduziert vorkamen und bei Mucosa aus Fistelarealen sogar ganz fehlten. Bei Darmschleimhaut aus stenosierten Arealen hingegen waren beide Formen deutlich vermehrt nachweisbar (Brenmoehl J et al., 2004). Dies erklärt die gesteigerte Migration der Zellen aus den stenosierten Bereichen auf der einen Seite und die verminderte Migration der Myofibroblasten aus den fistulierten Arealen auf der anderen Seite. Da bekannt war, dass der Integrin-Ligand Fibronectin sowohl bei Zellen aus Bronchialkarzinomarealen (Meng XN et al, 2009) als auch bei intestinalen Myofibroblasten dosisabhängig Migration induzieren kann (Leeb S et al., 2002), wurde der Einfluss von unterschiedlichen Fibronectinkonzentrationen auf intestinale Myofibroblasten von Morbus Crohn-Patienten aus stenosierten, fistulierten und

entzündeten Arealen untersucht, um Aussagen über die Empfindlichkeit der einzelnen Myofibroblastentypen machen zu können. Dabei zeigte sich, dass Fibronectin mit steigender Konzentration eine zunehmende Migration bei allen drei untersuchten Gruppen bewirken kann. Die Zellen aus den Stenosearealen legten eine deutlich gesteigerte Migration an den Tag, wohingegen die Fibroblasten aus den fistulierten Bereichen im Vergleich zu den CD-CLPF aus entzündeter Mucosa signifikant weniger wanderten. Damit war eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Fibronectin auf Seiten der intestinalen Myofibroblasten aus stenosierten Arealen bewiesen.

Zusammenfassend ließ dies den Schluss zu, dass sich intestinale Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und entzündeten Arealen phänotypisch voneinander unterscheiden; durch unterschiedlich stark ausgeprägte Fibronectinproduktion einerseits und differierende Empfindlichkeit gegenüber Fibronectin andererseits kommt es zu unterschiedlichen Migrationspotentialen.

Noch vor einigen Jahren betrachtete man die Extrazellulärmatrix (ECM) als ein passives Gebilde, das den Zellen lediglich als strukturelle Stütze dient (Abbildung 5-1).

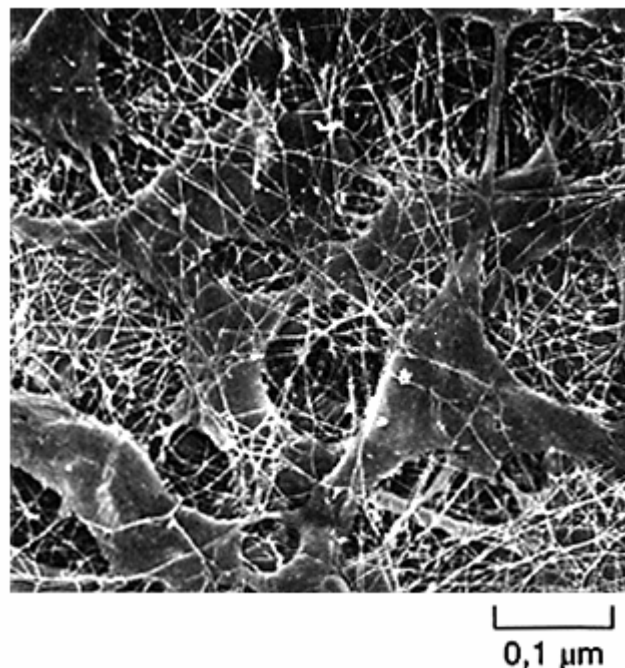


Abb. 5-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme: Fibroblasten umgeben von kollagenen Fasern der ECM (in Anlehnung an Alberts B, „Molekularbiologie der Zelle“, 2004, 4. Auflage, S. 1266)

In letzter Zeit wurde in diversen Arbeiten gezeigt, dass die Extrazellulärmatrix vielmehr ein dynamisches Konstrukt ist, das eine Reihe von physiologischen Prozessen induzieren kann. Über Integrine kommt es zur Regulation von Zellwachstum, Migration, Differenzierung und Organisation von Zellen zu einer Gewebeform (Alberts B, 2004). Auch bei chronisch-

entzündlichen Erkrankungen spielt die ECM eine bedeutende Rolle: in entzündeten Geweben findet ein gesteigerter ECM-Umbau statt (Korhonen M et al., 2000), was zu morphologischen Veränderungen der Gewebearchitektur führt. McKaig konnte nachweisen, dass im Darm eine vermehrte ECM-produktion die Entstehung von Stenosen begünstigt (McKaig BC et al., 2003). Kirkegaard begründet die Entstehung von Fisteln bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen durch Veränderungen der ECM (Kirkegaard T et al., 2004). Aufgrund der Bedeutsamkeit der ECM für die im Körper ablaufenden Vorgänge war es wünschenswert, ein Modell zu konstruieren, mit dem das Verhalten von humanen intestinalen Fibroblasten in ihrem physiologischen Umfeld simuliert und analysiert werden konnte.

Bis dato gelten zweidimensionale Migrationsmodelle wegen der schwierigen Datenerhebung in 3D-Modellen (Rey SM et al, 2009) als Standard, wissend, dass zweidimensionale Konstrukte die Situation in einem dreidimensionalen Organ wie dem Darm nicht entsprechend widerspiegeln können (Liu YW et al, 1998).

Durch unser neu etabliertes dreidimensionales Migrationsmodell ist es gelungen, *in vitro* Untersuchungen durchzuführen, die den Verhältnissen *in vivo* sehr nahe kommen. Wir konnten zeigen, dass auch im dreidimensionalen Matrixmodell die Myofibroblasten aus den stenosierten Arealen im Vergleich zu Myofibroblasten aus entzündeter Morbus Crohn-Mukosa ein signifikant gesteigertes Migrationspotential besitzen, wobei die Fibroblasten aus entzündeter Mucosa die Zellen aus den fistulierten Bereichen in ihrem Migrationspotential signifikant übertreffen.

Dieses Migrationsmodell ist bis jetzt einzigartig, wobei dem Erbium-YAG-Laser eine besondere Bedeutung zukommt. Sowohl in der Dermatologie und Ophthalmologie als auch in der Zahnmedizin gehört dieses Lasersystem seit noch nicht all zu langer Zeit zum klinischen Standard. Während die Dermatologie vor allem die Behandlung von epidermalen Naevi als Haupteinsatzgebiet sieht (Pearson IC et al., 2004), findet er auch bei ästhetischen Operationen (Alster TS et al., 2004; Fincher EF et al., 2004) und Narbenkorrekturen (Nocini PF et al., 2003) Verwendung. Cheng begründet den positiven Einfluss auf Narbengewebe damit, dass die Strahlung zu einer reduzierten TGF- β -Produktion führt, was wiederum eine verminderte Neigung des Gewebes zur Fibrosierung bewirkt (Cheng ET et al., 2003). In der Ophthalmologie schätzt man ebenfalls die Anwendungssicherheit und den geringen thermischen Schaden, der beim Gewebeabtrag entsteht. So werden heute Capsulotomien (Radner et al., 2004), Sklerotomie (Pallikaris IG et al., 2003) und retinale Eingriffe (Joseph DP et al., 2004) mittels Laserstrahlung erfolgreich durchgeführt. Haupteinsatzgebiet für den Erbium-YAG-Laser ist allerdings die Zahnheilkunde. So werden mittlerweile

Zahnwurzelkanäle (van As G et al., 2004; Flax HD et al., 2004) und Implantate (Miller PJ et al., 2004) mittels Laserstrahlung desinfiziert. Die geringe thermische Belastung der benachbarten Strukturen prädestiniert dieses Lasersystem für peridontale Eingriffe (Ishizaki NT et al., 2004; Ishikawa I et al., 2004).

Der gute Gewebeabtrag, verbunden mit einer geringen Hitzeentwicklung, macht diesen Laser für die Bestrahlung eines Zell-Matrix-Verbundes so geeignet. Ein noch schonenderes Verfahren könnte mit einem so genannten femtosecond-Laser erzielt werden, der in der Innenohrchirurgie wegen seiner noch geringeren Hitzeentwicklung bereits dem Erbium-YAG-Laser vorgezogen wird (Schwab B et al., 2004). Ebenfalls eine Alternative zu den genannten Systemen ist der low-powered-excimer-Laser, der in neuesten Untersuchungen eine noch geringere thermische Belastung des umliegenden Gewebes ergab als die beiden vorher erwähnten Systeme (Vaughan MB et al., 2004). Ob diese Systeme dem Erbium-YAG-Laser bei der Bestrahlung eines Matrix-Zellverbundes überlegen sind, ist in späteren Untersuchungen noch zu klären. Die Praktikabilität des hier eingesetzten Versuchsaufbaus könnte durch den Einsatz einer Brutkammer mit integriertem Mikroskop noch verbessert werden. Leider stand diese Gerätschaft zur Durchführung dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der *Boydenkammer*-Versuche aus der humanmedizinischen Dissertation durch dieses dreidimensionale Modell bestätigt werden. Die Überlegenheit dieses Modells gegenüber der *Boydenkammer* begründet sich darin, dass die Verhältnisse *in vivo* besser simuliert werden können und so der Bezug zum Patienten besser hergestellt werden kann. In künftigen Versuchsansätzen sollte vor allem der Einfluss von migrationswirksamen Substanzen wie IFN γ , Fibronectin oder TGF β auf Myofibroblasten aus stenosierten oder fistulierten Darmarealen untersucht werden.

5.2 Die Fokale Adhesion Kinase (FAK) als wesentlicher Faktor der Migration von Myofibroblasten

In einer Vorarbeit von S. Leeb konnte gezeigt werden, dass sowohl die Tyrosinphosphorylierung als auch die quantitative Expression von p125 FAK bei Darmschleimhaut-Myofibroblasten von Patienten mit M. Crohn im Vergleich zu Myofibroblasten aus Darmschleimhaut gesunder Vergleichspatienten signifikant erniedrigt

ist. Des Weiteren ist bekannt, dass sich die Zellmigration sowohl zu der Menge der zytosolischen FAK-Proteinmenge als auch zu deren Phosphorylisierungsgrad direkt proportional verhält (Haq F et al, 1998).

Untersuchungen mit FAK-Mutanten, denen die Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 397 (SH2-Bindestelle), die primäre p130-Bindestelle oder die Kinaseaktivität fehlte, zeigten ein gestörtes Migrationsverhalten der FAK-defizienten Zellen. Außerdem ließ sich bei diesen Zellen eine gesteigerte Migration mittels Fibronectin nicht erzeugen (Sieg DJ et al., 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass FAK für die Integrin-vermittelte Zellmigration eine wesentliche Rolle spielt. In dieser Arbeit wurde die Expression von FAK während der Migration von Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und rein entzündlich veränderten Darmarealen untersucht. In der humanmedizinischen Dissertation konnte gezeigt werden, dass sich Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und rein entzündlich veränderten Darmarealen hinsichtlich ihres Migrationspotentials unterscheiden, wobei die Zellen aus stenosierten Bereichen ein signifikant größeres Potential zeigten als Zellen aus rein entzündlich veränderter Darmschleimhaut. Diese allerdings übertrafen wiederum Zellen aus fistulierten Abschnitten hinsichtlich des Migrationspotentials signifikant.

Im Verwundungs-Assay zeigten Myofibroblasten aus stenosierten Darmarealen eine signifikant erhöhte FAK-Expression im Vergleich zu Myofibroblasten aus rein entzündlich veränderten Darmarealen, bei denen die FAK-Expression im Beobachtungszeitraum abnahm. Eine noch deutlichere Abnahme der Expression ergab sich bei Myofibroblasten aus fistulierten Abschnitten. Die gleichen Tendenzen zeigten sich bei Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und rein entzündlich veränderten Darmarealen nach 3-tägiger Inkubation mit IFN- γ und TNF und anschließender 7-tägiger Normalkultivierung auf einem insgesamt niedrigeren Niveau der FAK-Expression, was die Ergebnisse der Vorarbeit bestätigte, wonach eine IFN- γ /TNF- Inkubation zu einer Reduktion des Migrationspotentials führt. Eine reduzierte FAK-Expression korreliert also mit einer reduzierten Migrationsleistung in vitro.

FAK ist ein Rezeptor-Brückenprotein, das Signaltransduktionswege von Wachstumsfaktoren und Integrinen verbindet (Sieg DJ et al., 2000). In FAK-defizienten Zellen lässt sich durch PDGF-BB keine Migration induzieren. In FAK-defizienten Zellen, die oben genannte FAK-Mutanten tragen, ließ sich durch PDGF Migration induzieren, wobei eine Tyrosin-Phosphorylierung erfolgte. Nur in FAK-defizienten Zellen, die die FAK-Mutante exprimierten, der die Autophosphorylierungsstelle Tyr397 fehlte, ließ sich keine Migration induzieren. Daraus lässt sich schließen, dass es in FAK eine gemeinsame Bindungsstelle gibt,

die sowohl für die Fibronektin-induzierte als auch die PDGF-induzierte Migration nötig ist. Dies ist die Autophosphorylierungsstelle Tyr397 (SH2-Bindestelle) (Sieg DJ et al., 2000).

An die FAK Tyr397-Stelle binden PTKs der Scr-Familie, wobei die katalytische Aktivität von PTKs den Umsatz von fokalen Kontakten während der Zellmigration unterstützt (Fincham VJ and Frame MC, 1998; Brunton VG et al., 1997). Bei der PDGF-induzierten Migration wird im Gegensatz zur Fibronektin-induzierten Migration die Kinaseaktivität nicht gebraucht und FAK nach PDGF-Stimulation von anderen PTKs transphosphoryliert. Es assoziieren PDGF-Rezeptor und Tyrosin-phosphoryliertes FAK (Sieg DJ et al., 2000). In FAK-defizienten Zellen lässt sich ebenfalls keine Migration mit EGF induzieren, obwohl der EGF-Rezeptor Tyrosin-phosphoryliert war. Hier assoziierte ebenfalls aktivierter EGFR mit FAK nach Wachstumsfaktorstimulation. Auch hier ließ sich in FAK-defizienten Zellen, die die FAK-Mutante ohne Autophosphorylierungsstelle Tyr397 exprimierten, trotz Stimulation mit dem Wachstumsfaktor keine Migration induzieren. Diese FAK-Mutante konnte also weder Integrin- noch Wachstumsfaktor-stimulierte Migration unterstützen, da keine SH2-medierte Bindung eines Adapterproteins an Tyr397 möglich war und sich somit kein Signaling-Komplex mit nachgeschalteten Zielproteinen wie PTKs der Scr-Familie ausbilden konnte (Sieg DJ et al., 2000).

Die Integrität des N-terminalen Endes der FAK ist von großer Bedeutung um Interaktionen mit dem EGFR zu medieren. Nur so findet eine Assoziation zwischen EGFR und FAK für eine resultierende Zellmigration statt. Auch bei EGF-induzierter Migration wird die Kinaseaktivität von FAK nicht gebraucht, was darauf hinweist, dass FAK während der Stimulation mit Wachstumsfaktoren Substrat für andere PTKs ist. Obwohl EGF nur dann Migration induzieren kann, wenn ein aktivierter EGFR an den N-Terminus von FK bindet und Tyr397 phosphoryliert wird, braucht FAK zusätzlich sein C-terminales Ende, um seine volle Funktion der Migrationsinduktion zu entfalten. Die C-terminale Domäne von FAK bindet an Integrin-Rezeptor Kluster (Leeb S., 2002, Sieg DJ et al., 2000).

Fibronektin scheint also für die Migration von intestinalen Myofibroblasten ein obligatorischer Stimulus zu sein, der aber durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren noch getriggert werden kann. Daraus lässt sich folgern, dass bei der autokrinen Stimulation der Myofibroblastenmigration die Lokalisation des C-Terminus von FAK bei Integrin-Rezeptor Cluster und die Phosphorylierung an Tyr397 nötig ist und optional eine durch Wachstumsfaktoren stimulierte Bindung aktivierter Wachstumsfaktorrezeptoren an den N-Terminus möglich ist, um die Fibronektin induzierte Migration noch zu erhöhen.

Um die Fibronektin induzierte Migration zu unterstützen, ist die Kinase Aktivität von FAK nötig und die direkte Bindung von FAK an p130 (Cary LA et al., 1998). Für PDGF- oder EGF-induzierte Migration gilt dies allerdings nicht. Eine Erklärung hierfür wäre, dass Integrine keine intrinsische katalytische Aktivität besitzen. Dies wird durch Arbeiten von Jones et al. gestützt, indem er beschreibt, dass IGF-1 stimulierte Migration von glatten Muskelzellen nur in Gegenwart von Serum oder Vitronektin möglich war, weil nur so eine Ligand-Bindung an alpha V beta 3 Integrin (Vitronektinrezeptor) möglich war (Jones JJ et al., 1995).

Wundheilung und Fibrosierung im Kontext der Myofibroblastenmigration

Die Mechanismen der (gestörten) Wundheilung sind bis heute nicht in Gänze verstanden. Allerdings liefert diese Arbeit Ansatzpunkte für weitere Hypothesen und Untersuchungen. IFN- γ hemmt das Migrationspotential von intestinalen Myofibroblasten bei Morbus Crohn-Patienten und Gesunden (vgl. Leeb S, 2002). TNF jedoch übt eine inhibierende Funktion lediglich bei intestinalen Myofibroblasten aus gesunder Schleimhaut aus, was dafür spricht, dass intestinale Myofibroblasten von Morbus Crohn- Patienten gegen TNF durch das ubiquitäre entzündliche Milieu relativ inert geworden sind. Dennoch scheint klar, dass sowohl TNF als auch IFN- γ die Wundheilung stören und so das Entstehen von Fissuren und Fisteln begünstigen. Auf der anderen Seite führt eine überschießende Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu einer erhöhten Extrazellulärmatrix-Produktion (Graham MF, 1995), was in der Bildung von Stenosen und Strikturen resultieren kann. Potenzierend kommt das reduzierte Abwandern von Zellen in Anwesenheit von TNF und IFN- γ hinzu, was die Stenose-Entstehung begünstigt. Diese Erkenntnisse könnten vielleicht einer Verbesserung der Therapie fistulierender und stenosierender Verläufe des Morbus Crohn dienlich sein und Ansätze für neue Untersuchungen liefern.

Die Ursachen der Komplikationen bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn beruhen oft auf einer gestörten Wundheilung; hinzu kommt, dass momentan kaum effektive präventive Behandlungsmethoden zur Verfügung stehen, was dazu führt, dass als *ultima ratio* häufig nur ein operativer Eingriff bleibt (Pucilowska JB et al., 2000). Probleme wie große Wundflächen und Ulzerationen (Lorenz D et al., 1993), sowie mangelhafte Wundheilung nach Proktektomie (Waits JO et al., 1982) oder Proktokolektomie (Hartz RS et al., 1980) machen häufig zusätzliche operative Versorgungen notwendig.

Vor allem beim Morbus Crohn ist die Fibrosierung der Darmwand als Folge einer überschießenden Wundheilung eine häufige Komplikation und die Hauptursache für eine Darmresektion (Pucilowska JB et al., 2000). Weitere Komplikationen sind refraktäre Fisteln und Abszesse, die durch eine insuffiziente Wundheilung entstehen können. Die Ursache für die Komplikationen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen liegt höchstwahrscheinlich in einer pathologischen Wundheilung; über deren Mechanismen ist noch nicht viel bekannt. Nachdem S. Leeb nachweisen konnte, dass Morbus Crohn-Fibroblasten wesentlich schwächer migrieren als Kontrollfibroblasten, konnte dieses Ergebnis durch die vorliegende Arbeit noch etwas konkretisiert werden, indem nachgewiesen wurde, dass Myofibroblasten aus stenosierten Bereichen wesentlich stärker wanderten (erhöhte Fibroseneigung) als die CD-CLPF aus rein entzündlich veränderten Darmarealen, während die Myofibroblasten aus fistulierten Arealen signifikant weniger migrierten (reduzierte Fibroseneigung). Dies veranlasste dazu, den Einfluss von Entzündungsmediatoren wie TNF und IFN γ , die im chronisch entzündeten Darmgewebe bei Morbus Crohn in großem Maße präsent sind (Holtmann MH et al., 2002), auf das Migrationsverhalten der Crohn-Fibroblasten *in vitro* zu untersuchen, um Therapiekonzepte mit TNF- oder IFN γ -Antikörpern zu bestätigen oder in Frage zu stellen.

IFN γ :

Die Therapie mit INF γ gilt zurzeit bei schweren Verläufen der idiopathischen Lungenfibrose als Mittel der Wahl (Selmann M et al., 2004). Ebenso verbessert es die Hautmanifestationen der systemischen Sklerose (Bletry O et al., 2002). Bei der Therapie von Morbus Crohn-Patienten finden anti-IFN γ Antikörper wie Fontolizumab mit wechselndem Erfolg Verwendung (Sandborn WJ et al., 2004).

Der in der Vorarbeit von S. Leeb gezeigte reduktive Einfluss von IFN γ auf die Migration von Kontrollfibroblasten (Leeb S et al., 2002) gesunder Patienten konnte bei Morbus Crohn-Fibroblasten im Rahmen der humanmedizinischen Dissertation bestätigt werden. Das

signifikant reduzierte Migrationsverhalten der Morbus Crohn-Fibroblasten nach Inkubation mit IFN γ ergänzte die Ergebnisse von Adelman-Grill, wonach sowohl normale menschliche Zellen als auch virus- oder tumortransformierte Zellen auf IFN γ mit einer verminderten Migration reagierten (Adelman-Grill BC et al., 1987). Bei der idiopathischen Lungenfibrose, ebenfalls ein Vertreter der fibrotischen Erkrankungen, bei dem die IFN γ Aktivität systemisch vermindert ist (Aggarwal AN et al., 2000), kann ein ebensolcher Effekt beobachtet werden. So bewirkt IFN γ vor allem bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf eine deutliche Senkung der Mortalität (King TE et al., 2005) und eine Verbesserung der Lungenfunktionsparameter Vitalkapazität und Diffusionskapazität, was vom Autor auf eine verminderte Migrationstendenz der Typ2-Pneumocyten zurückzuführen ist (Nathan SD et al., 2004). Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen von Scala, der bei der systemischen Sklerose, einem weiteren Vertreter der fibrotischen Erkrankungen, eine verminderte Konzentration von IFN γ bei gleichzeitig erhöhten Werten für TNF beschreibt (Scala E et al., 2004). Auch in der Angiogenese wird ein migrationsinhibierender Effekt von IFN γ auf mikrovasculäre Endothelzellen beschrieben (Maier JA et al., 1999). Ebenso hemmt IFN γ die Migration von aortalen Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Kipshidze N et al., 2002). Das von uns beobachtete reduzierte Migrationsverhalten von Morbus Crohn-Fibroblasten auf IFN γ wird durch Yamanakas Beobachtungen bestätigt, wonach subconjunctivale Fibroblasten im Wundungsmodell nach Behandlung mit IFN γ eine reduzierte Tendenz des Wundverschlusses zeigen (Yamanaka O et al., 2003). Als Erklärung vermutet man eine durch das IFN γ verminderte Empfindlichkeit der Zellen auf die migrationsfördernde Substanz TGF β (Blettry O et al., 2002), die zu einer überschießenden Wundheilung und Narbenbildung (Komarcevic A et al., 2000), sowie zu Fibrosen (Sime PJ et al., 2001) führt. Schließlich wirkt IFN γ auch bei Sarkoidosen anti-proliferativ (Tamura R et al., 1998).

Über welche Mechanismen dies genau geschieht ist bis heute noch nicht ganz verstanden. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Reduktion der FAK-Expression nach dreitägiger Inkubation von CD-CLPF könnte ein Erklärungsansatz für die funktionelle Veränderung der Zelle, was sich in einem reduzierten Migrationspotential widerspiegelt, sein. Dieses reduzierte Migrationsverhalten wurde von Albin und Pontz auch bei älteren Fibroblasten beobachtet (Albin A et al., 1988) und Pfeffer zeigte, dass sich IFN γ -behandelte Zellen wie alternde Fibroblasten verhielten (Pfeffer LN et al., 1980). Die Induktion von Migration ist ein Rezeptor-vermittelter Prozess, der eine reibungsfreie Interaktion zwischen Rezeptor und Fibronektin voraussetzt (Albin A et al., 1988). IFN γ beeinflusst die Verteilung von

Fibronectin in der Zelle, was eventuell den migrationsmodulierenden Effekt erklären könnte (Gerfaux J et al., 1981). Der mögliche TGF β -Antagonismus wurde oben schon beschrieben. Einen anderen Ansatz liefert Brouty-Boye, der postuliert, dass IFN γ einen Einfluss auf das Zytoskelett besitzt, was ein wichtiges Organell für die Zellbewegung darstellt (Brouty-Boye D et al., 1981). Im Verbund mit unseren Ergebnissen scheint die Theorie eines veränderten Rezeptorstatus für Fibronectin als am wahrscheinlichsten. Als sicher kann die migrationshemmende Wirkung betrachtet werden, die in zukünftigen Therapieschemata gezielt gegen stenosierende Verläufe eingesetzt werden sollte.

TNF:

Die anti-TNF-Therapie wird seit geraumer Zeit bei chronischer Fistelung eingesetzt, wobei nur ca. 50% der Patienten langfristig beschwerdefrei bleiben (ACCENT II-Studie, 2004).

In der Literatur wird die Wirkung von TNF auf die Migration von Zellen konträr behandelt. Während eine migrationsinhibierende Wirkung auf Darmfibroblasten (Leeb S et al., 2003) und mikrovaskuläre Endothelzellen (Maier JA et al., 1999) beschrieben wird, wirkt es auf Fibroblasten aus anderen Geweben migrationsinduzierend (Postlethwaite AE et al., 1990). So konnte gezeigt werden, dass bei typischen fibrotischen Krankheitsbildern, wie der systemischen Sklerodermie oder der idiopathischen Lungenfibrose, TNF eine bedeutende Rolle bei der Fibroseentstehung spielt (Alekperov RT et al., 2003; Bolster MB et al., 1997; Krein PM et al., 2002; Lasky JA et al., 2000; Thrall RS et al., 1997). Selmann stellt sogar fest, dass Fibroblastenmigration und -proliferation, die unter anderem durch TNF induziert werden, ursächlich für die Lungenfibrose wären (Sermann M et al., 2004). Auch beim Morbus Crohn scheint TNF eine bedeutende Rolle in der Pathogenese zu spielen. So ist im Vergleich zu Kontrollzellen auf den T1-Zellen der Lamina propria der TNF-Rezeptor Typ2 deutlich verstärkt exprimiert (Holtmann MH et al., 2002). Dieses Phänomen ist auch bei der Lungenfibrose zu beobachten, wo der TNF-Rezeptor Typ2 ebenfalls hochreguliert ist (Pantelidis P et al., 2001). Ebenso ist bei onkologischen Therapien mit Bleomycin gehäuft mit der fatalen Nebenwirkung der Lungenfibrose zu rechnen, wenn der Patient einen TNF α 2-Genpolymorphismus aufweist, was mit einer verstärkten Produktion von TNF einhergeht (Libura J et al., 2002). Eine Erklärung für diese Beobachtungen liefert Vancheri, indem er postuliert, dass die Produktion von TNF durch aktivierte Monozyten normalerweise durch das, von Fibroblasten bei Kontakt mit TNF produzierte PGE₂, ein Fibroblastenmigration-hemmendes Agens (White ES et al., 2005), in einer Art Kontrollregelkreis reguliert wird. Bei fibrotischen Fibroblasten sind allerdings die TNF-Rezeptoren an der Oberfläche vermindert

ausgebildet, was zu einer zu geringen Ausschüttung von PGE₂ führt und in einer unkontrollierten TNF-Produktion endet (Vancheri C et al., 2000). Spoelstra begründet die migrationsinduzierende Wirkung von TNF mit einer verstärkten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM1 und VCAM1 durch TNF (Spoelstra FM et al., 1999).

Goetze und Mitarbeiter wiesen bei Muskelzellen von Rattenaorten nach, dass eine frühe Aktivierung der MAP-Kinase ein entscheidender Schritt in der TNF-vermittelten Signaltransduktion ist, der zur Migration der Muskelzellen führt; allerdings war nur der TNF-Rezeptor-1 und nicht der TNF-Rezeptor-2 an der Migrationsinduktion beteiligt (Goetze S et al., 1999).

In Untersuchungen im Rahmen der humanmedizinischen Dissertation führte eine dreitägige Inkubation der Zellkulturen mit TNF und anschließender Normalpassagierung für eine Woche zu keiner Veränderung des Migrationsverhaltens. Dies lässt den Schluss zu, dass im Migrationsmodell Morbus Crohn-Myofibroblasten relativ unsensibel auf TNF reagieren, was die momentan aktuelle anti-TNF-Therapie bei stenosierenden Verläufen in Frage stellt. Außerdem ist zu vermuten, dass die Myofibroblasten bei chronisch entzündlichen Erkrankungen keine globale Veränderung des Zellaufbaus erfahren, sondern eher eine ganz selektive. Dies bestätigt G. Rogler in einer Untersuchung, wonach IFN γ /TNF- behandelte Zellen keine signifikante Veränderung der Zytokinexpression zeigten (Rogler G et al., 2001).

Was nun im Letzten an der Entstehung von Stenosen und Fisteln ursächlich ist, kann nur vermutet werden. So wäre es denkbar, dass eine IFN γ -vermittelte punktuelle Veränderung der zellulären Rezeptordichte für Fibronektin zu einer verminderten Einwanderungsfähigkeit in Wundareale führt; dies könnte zu einer schlechten Wundheilung und, in Verbindung mit einer gesteigerten Proliferation der Zellen, zur Entstehung von Fisteln führen. Die Stenosenentstehung wiederum ließe sich durch eine gesteigerte Sensibilität gegenüber Fibronektin und konsekutiv vermehrtes Einwandern in Wundareale erklären. In Verbindung mit einer erhöhten Zellproliferation wäre ein Verschluss des Darmlumens die Folge. Unter Berücksichtigung der Fibronektinisoformen ED-A und ED-B in der Diagnostik, könnte eine gezielte migrationshemmende Therapie mit IFN γ die Progression von Stenosen positiv beeinflussen.

Insgesamt kann man sagen, dass unsere Ergebnisse eine Erklärung für die Ergebnisse der ACCENT II Studie liefern. Die Studie zeigte, dass eine reine Blockade von TNF bei Morbus Crohn nicht den gewünschten Erfolg brachte. Mit dem Hintergrundwissen, dass Morbus Crohn-Fibroblasten nicht besonders sensibel auf TNF reagieren, erscheint dieses Ergebnis plausibel.

6 Zusammenfassung

- In der vorangegangenen humanmedizinischen Dissertation zeigte sich in *Migrations-Assays* in der modifizierten Boydenkammer, dass die Zellen aus den stenosierten Arealen unabhängig vom konditionierten Medium stärker migrierten als die Zellen aus entzündlich veränderter Darmschleimhaut. Die intestinalen Myofibroblasten aus den fistulierten Arealen hingegen wanderten signifikant weniger als die Zellen aus entzündeter Mucosa. Insgesamt migrierten die intestinalen Myofibroblasten auf konditioniertem Medium von Zellen aus Stenosearealen am besten, was für eine verstärkte autokrine Sekretion von Fibronectin der Zellen aus den stenosierten Bereichen sprach.

Darauf aufbauend wurden in dieser Arbeit intestinale Myofibroblasten von Morbus Crohn-Patienten mit stenosierenden, fistulierenden und rein entzündlichen Verläufen zuerst isoliert und kultiviert. In einem neu etablierten dreidimensionalen Migrationsmodell ist es gelungen, das Migrationsverhalten von Morbus Crohn-Myofibroblasten aus stenosierten, fistulierten und entzündeten Arealen in ihrer autokrin produzierten Extrazellulärmatrix zu analysieren. Es zeigte sich, dass die Zellen aus den stenosierten Arealen den mittels Laser erzeugten Defekt am schnellsten verschließen konnten, während die Fibroblasten aus entzündeter Mucosa die Fistel-Zellen hinsichtlich der Geschwindigkeit des Defektverschlusses noch übertrafen. Dies bestätigte die Ergebnisse der Boydenkammer-Experimente und stellte klar, dass die drei untersuchten Zellgruppen unterschiedliche Phänotypen darstellen.

- S. Leeb konnte in Ihren Vorarbeiten zeigen, dass bei intestinalen Myofibroblasten eine reduzierte Migrationsleistung mit einer Reduktion der Expression und Phosphorylierung der *Fokal Adhesion Kinase* (FAK) einhergeht. Nun konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Erkenntnis auch auf intestinale Myofibroblasten von M. Crohn-Patienten zu übertragen ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Migrationsleistung von Zellen aus stenosierten Arealen mit einer erhöhten FAK-Expression einhergeht. Bei Zellen aus entzündlich veränderter Darmschleimhaut lag die FAK-Expression analog zur Migrationsleistung über der von intestinalen Myofibroblasten aus den fistulierten Arealen.

- Abschließend konnte gezeigt werden, dass eine mehrtägige Inkubation mit TNF und INF γ und darauffolgende Normalpassagierung der drei untersuchten Zellgruppen zu einer Reduktion der FAK-Expression analog der Migrationsleistung führt.

Dieser migrationshemmende Einfluss auf die Myofibroblasten könnte in der Pathogenese der Fistelentstehung eine wichtige Rolle spielen, könnte allerdings auch in der gezielten Therapie der stenosierenden Verläufe des Morbus Crohn eingesetzt werden.

Durch die Ergebnisse aus dieser und der vorangegangenen Arbeit ist damit der Beweis gelungen, dass sich die drei untersuchten Zellgruppen (intestinale Fibroblasten aus stenosierten, fistulierten und nur entzündlich veränderten Bereichen) hinsichtlich ihres Migrationspotentials deutlich voneinander unterscheiden und auch auf Reize wie Kontakt mit Fibronectin oder TNF und IFN γ unterschiedlich reagieren. Bei allen Versuchen wurde deutlich, dass intestinale Morbus Crohn-Myofibroblasten aus stenosierten Arealen im Vergleich zu CD-CLPF aus entzündeter Mucosa ein gesteigertes Migrationspotential besitzen, und dass intestinale Morbus Crohn-Myofibroblasten aus fistulierten Bereichen signifikant weniger migrieren als die CD-CLPF aus rein entzündlich veränderter Schleimhaut. Dies korreliert mit einer proportionalen FAK-Expression.

Ausblick:

Vor allem das reduzierte Migrationspotential der Fistel-Zellen und die Empfindlichkeit der Zellen auf IFN γ sollte Anlass für neue Untersuchungen geben und könnte ein erster Schritt für die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von stenosierenden und fistulierenden Verläufen des Morbus Crohn sein. Künftige Therapien sollten sowohl auf die Entzündung abzielen, als auch der unterschiedlichen Migration und Proliferation der Fibroblasten bei Morbus Crohn Rechnung tragen. So wäre es wünschenswert, dass die verschiedenen Verläufe zukünftig gezielt unterschiedlichen Therapieschemata zugeführt werden. In Fistelmodellen sollte die Wirkung von migrationsfördernden Substanzen, wie zum Beispiel menschlichen anti-IFN γ Antikörpern untersucht werden. Bei stenosierenden Verläufen hingegen, sollte die Hemmung der Zellmigration ähnlich der Therapie der idiopathischen Lungenfibrose im Vordergrund stehen. Denkbar wäre zum Beispiel die Anwendung von anti-TNF-AK und IFN γ mit dem Ziel, das offensichtlich bestehende Ungleichgewicht zwischen TNF, also Fibrose, und IFN γ , das migrationshemmend wirkt, wieder herzustellen. Außerdem sollte man über eine gezielte Hemmung der migrationinduzierenden Substanzen Fibronectin und TGF β nachdenken und in künftigen Versuchen an intestinalen Morbus Crohn-Fibroblasten erproben.

7 Literaturverzeichnis

Abedi H, Dawes KE, Zachary I. „Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts.” J Biol Chem. 1995 May 12;270(19):11367-76.

Abedi H, Zachary I. “Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration.” Cardiovasc Res. 1995 Oct;30(4):544-56. Review.

Adams, T. C.; Pang, P. K "Lasers in aesthetic dentistry." Dent.Clin.North Am. 2004.Oct.;48.(4):833.-60.

Adelmann-Grill, B. C. et al. "Inhibition of fibroblast chemotaxis by recombinant human interferon gamma and interferon alpha." J.Cell Physiol 1987.Feb.;130.(2):270.-5.2:270-5.

Adler, G. "Morbus Crohn - Colitis Ulcerosa", Springer Verlag, 1996

Aggarwal, AN; Behera, D "Interferon-gamma 1b: impact of new indications (idiopathic pulmonary fibrosis)." Expert Opin Pharmacother. 2000 Dec; 1(7):1423-7

Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. D. "Molekularbiologie der Zelle", VCH, 2004.

Albini, A.; Pontz, B.; Pulz, M.; Allavena, G.; Mensing, H.; Muller, P. K. "Decline of fibroblast chemotaxis with age of donor and cell passage number." Coll.Relat Res.1988, 8, 23-37

Alekperov, RT; Timchenko, AV; Nasonov, EL; "Tumor necrosis factor alpha in systemic scleroderma." Klin Med (Mosk). 2003;81(12):4-7

Alster, T. S.; Doshi, S.; Hopping, S. "Combination surgical lifting with ablative laser skin resurfacing of facial skin: a retrospective analysis." Dermatol.Surg. 2004.Sep.;30(9):
1191.-5.9:1191-5.

Beutler, B. "Autoimmunity and apoptosis: the Crohn's connection." Immunity. 2001.Jul.;15(1)
5-14.1:5-14.

Binder, V.; Orholm, M. "Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease"." Neth. J. Med. 48, 53-56; 1996

Bletry, O; Somogyi, A; "Do the interferons have an antifibrotic action? The internist's point of view" Rev Med Interne. 2002 Nov; 23 Suppl4:511s-515s

Bolster, MB; Ludwicka, A; Sutherland, SE; Strange, C; Silver, RM; "Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis." Arthritis Rheum. 1997 Apr;40(4):743-51

Bonner, JC. "Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases." Cytokine Growth Factor Rev.2004 Aug; 15(4):255-73

Bornstein, E. "Proper use of Er:YAG lasers and contact sapphire tips when cutting teeth and bone: scientific principles and clinical application." Dent.Today 2004.Aug.;23(8.):84.,
86.-9. quiz.

Braegger, C. P.; MacDonald, T. T. "Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease". Ann. Allergy 72, 135-141, 1994

- Brenmoehl, J.; Lang, M.; Hausmann, M.; Leeb, S.; Falk, W.; Schölmerich, J.; Göke, M.; Rogler, G. "Differential expression of fibronectin splice forms ED-A and ED-B in Crohn's disease (CD) mucosa, ddw 2004
- Brouty-Boye, D. ; Cheng, Y.S.; Chen, L. B. "Association of phenotypic reversion of transformed cells induced by interferon with morphological and biochemical changes in the cytoskeleton". Cancer Res. 41, 4174-4184, 1981
- Brouty-Boye, D.; Zetter, B. R. "Inhibition of cell motility by interferon". Science 208, 516-518, 1980
- Brunton VG, Ozanne BW, Paraskeva C, Frame MC. A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an in vitro model for the progression of colon cancer. Oncogene. 1997 Jan 23;14(3):283-93.
- Burmester, G.-R.; Pezzutto A. "Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor und Klinik". 1998.
- Capon, A.; Mordon, S. "Can thermal lasers promote skin wound healing?" Am.J.Clin.Dermatol. 2003.;4(1):1-12,1:1-12.
- Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK, Guan JL. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. J Cell Biol. 1998 Jan 12;140(1):211-21.
- Cheng, E. T.; Nowak, K.; Koch, R. "Effect of blended carbon dioxide and erbium:YAG laser energy on preauricular and ear lobule keloid fibroblast secretion of growth factors: a serum-free study." Arch.Facial.Plast.Surg. 2001.Oct.-Dec.;3(4):252.-7.4:252-7.

- Cheng, E. T.; Pollard, J.; Koch, R. "Effect of blended CO₂ and erbium:YAG laser irradiation on normal and keloid fibroblasts: a serum-free study." J.Clin.Laser Med.Surg. 2003.Dec.;21(6.):337.-43.6:337-43.
- Cho JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. Rev Gastroenterol Disord. 2003;3 Suppl 1:S18-22.
- Choi, MS; Ray, R; Zhang, Z; Mukherjee, AB; "IFN-gamma stimulates the expression of novel secretoglobin that regulates chemotactic cell migration and invasion." J. Immunol. 2004 Apr 1;172(7):4245-52
- Chowdhury, A.; Fukuda, R.; Fukumoto, S. "Growth factor mRNA expression in normal colorectal mucosa and in uninvolved mucosa from ulcerative colitis patients." J.Gastroenterol. 1996.Jun.;31(3):353.-60.3:353-60.
- Clark, R. A. et al. "Fibroblast migration on fibronectin requires three distinct functional domains." J.Invest Dermatol. 2003.Oct.;121(4):695.-705.4:695-705.
- Clyman RI, Mauray F, Kramer RH. "Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix." Exp Cell Res. 1992 Jun;200(2):272-84.PMID: 1374036
- Cooney RN, Kimball SR, Maish G 3rd, Shumate M, Vary TC. Effects of tumor necrosis factor-binding protein on hepatic protein synthesis during chronic sepsis. J Surg Res. 2000 Oct;93(2):257-64.
- Cukierman, E. et al. "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension." Science 2001.Nov.23;294.(5547.):1708.-12.5547:1708-12.

- Dale, P. D.; Sherratt, J. A.; Laurent, G. J. "Role of fibroblast migration in collagen fiber formation during fetal and adult dermal wound healing". Bull. Math.Biol. 59, 1077-1100, 1997
- Davies, HR; Richeldi, L; "Idiopathic pulmonary fibrosis: current and future treatment options." Am J Respir Med. 2002; 1(3):211-24
- Dean, J. W.; Blankenship, J. "Migration of gingival fibroblasts on fibronectin and laminin." J.Periodontol. 1997.Aug.;68.(8.):750.-7.8:750-7.
- Dignass, A. U.; Sturm, A. "Peptide growth factors in the intestine". Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13, 763-770, 2001
- Eckert W.A. und Kartenbeck J.; Proteine: Standardmethoden der Molekular- und zellbiologie. 1996
- Elsasser-Beile, U.; von Kleist, S.; Gerlach, S.; Gallati, H.; Monting, J. S. "Cytokine production in whole blood cell cultures of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis". J. Clin. Lab Anal. 8, 447-451; 1994
- Feist, I. S. et al. "Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser." J.Periodontol. 2003.Sep.;74.(9.):1368.-75.9:1368-75.
- Fincham VJ, Frame MC. The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. EMBO J. 1998 Jan 2;17(1):81-92.

- Fincher, E. F.; Gladstone, H. "Use of a dual-mode erbium:YAG laser for the surgical correction of rhinophyma." Arch.Facial.Plast.Surg. 2004.Jul.-Aug.;6.(4):267.-71.4:267-71.
- Flax, H. D.; Radz, G. "Closed-flap laser-assisted esthetic dentistry using Er:YSGG technology." Compend.Contin.Educ.Dent. 2004.Aug.;25.(8.):622., 626., 628.-30.passim.8:622) 626, 628-26, 630.
- Funakoshi, K.; Sugimura, K.; Sasakawa, T.; Bannai, H.; Anezaki, K.; Ishizuka, K.; Yoshida, K.; Narisawa, R.; Asakura, H. "Study of cytokines in ulcerative colitis". J. Gastroenterol. 30 Suppl 8, 61-63, 1995
- Gailit, J.; Clarke, C.; Newman, D.; Tonnesen, M. G.; Mosesson, M. W.; Clark, R. A. "Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha(v)beta3". Exp. Cell Res. 232, 118-126, 1997
- Gauss-Muller, V. et al. "Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis." J.Lab Clin.Med. 1980.Dec.;96.(6.):1071.-80.6:1071-80.
- Gerfaux, J.; Rousset, S.; Chany-Fournier, F.; Chany, C. "Interferon effect on collagen and fibronectin distribution in the extracellular matrix of murine sarcoma virus-transformed cells". Cancer Res.41, 3629-3634, 1981
- Goetze, S.; Xi, X. P.; Kawano, Y.; Kawano, H.; Fleck, E.; Hsueh, W. A.; Law, R. E. "TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent". Hypertension 33, 183- 189, 1999
- Goris, R. J. H. "Die Wundheilung: ein kontrollierter Entzündungsprozess". Aspekte im Gespräch - Extracta aus Wissenschaft und Klinik 7, Biotest Pharma GmbH, S. 8-16, 1997

- Graham, M. F. "Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease - an update". 1995.
- Graham, M. F. et al. "Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease." Gastroenterology 1988.Feb.;94.(2):257-65.2:257-65.
- Graham, M. F. et al. "Corticosteroids increase procollagen gene expression, synthesis, and secretion by human intestinal smooth muscle cells." Gastroenterology 1995.Nov.;109.(5):1454-61.5:1454-61.
- Grant, M. B.; Khaw, P. T.; Schultz, G. S.; Adams, J. L.; Shimizu, R. W. "Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis". Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 33, 3292-3301, 1992
- Grimm, M. C.; Elsbury, S. K.; Pavli, P.; Doe, D. W. "Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa". J. Leukoc. Biol. 59, 804-812, 1996
- Gross, V; Andus, T; Leser, HG; Roth, M; Schölmerich, J; "Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases." Klin Wochenschr. 1991 Dec 15;69(21-23):981-7
- Grotendorst, G. R. "Alteration of chemotactic response of NIH/3T3 cells to PDGF by growth factors, transformation and tumor promoters". Cell 36, 279-285, 1984
- Gruber, B. L.; Marchese, M. J.; Kew, R. R. "Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis". J.Immunol. 152, 5860-5867, 1994
- Guerra, L. et al. "Permanent repigmentation of piebaldism by erbium:YAG laser and autologous cultured epidermis." Br.J.Dermatol. 2004.Apr;150.(4):715-21.4:715-21.
- Haq F, Trinkaus-Randall V. Injury of stromal fibroblasts induces phosphorylation of focal adhesion proteins. Curr Eye Res. 1998 May;17(5):512-23.

- Hartz, R. S.; Poticha, S.; Shields, T. "Healing of the perineal wound." Arch.Surg. 1980.Apr;115.(4):471.-4.4:471-4.
- Heckmann, M., Adelman-Grill, B. C., Hein, R., Krieg, T. "Biphasic effects of interleukin-1 alpha on dermal fibroblasts: enhancement of echemotactic responsiveness at low concentrations and of mRNA expression for collagenase at high concentrations". J. Invest Dermatol., 100, 780-784, 1993
- Holtmann, M.H. et al. "Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo." Eur J Immunol. 2002 Nov, 32(11):3142-51
- Hugot, J. P.; Charmaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cezard, J. P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk, C.; O'Morain, C. A.; Gassull, M.; Binder, V.; Finkel, Y.; Cortot, A.; Modigliani, R.; Laurent-Puig, P.; Gower-Rousseau, C.; Marcy, J.; Colombel, J. F.; Sahbatou, M.; Thomas, G. "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease". Nature 411, 599-603, 2001
- Ishikawa, I.; Aoki, A.; Takasaki, A. "Potential applications of Erbium:YAG laser in periodontics." J.Periodontal Res. 2004.Aug.;39.(4):275.-85.4:275-85.
- Ishizaki, N. T. et al. "Thermographical and morphological studies of Er,Cr:YSGG laser irradiation on root canal walls." Photomed.Laser Surg. 2004.Aug.;22.(4):291.-7.4:291-7.
- Ito, M.; Yoshida, K.; Kyo, E.; Ayhan, A.; Nakayama, H.; Yasui, W.; Ito, H.; Tahara, E. "Expression of several growth factors and their receptor genes in human colon carcinomas". Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 59, 173-178, 1990

- Jobson, T. M.; Billington, C.; Hall, I. "Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation." J.Clin.Invest 1998.Jun.15.;101.(12.):2650-7.12:2650-7.
- Jones JI, Doerr ME, Clemmons DR. Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. Prog Growth Factor Res. 1995;6(2-4):319-27. Review.
- Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. Front Biosci. 1999 Mar 15;4:D303-9. Review.
- Joseph, D. P. et al. "A new and improved vitreoretinal erbium:YAG laser scalpel: long-term morphologic characteristics of retinal-choroidal injury." Ophthalmic Surg.Lasers Imaging 2004.Jul.-Aug.;35.(4):304.-15.4:304-15.
- Juliano RL, Haskill S. "Signal transduction from the extracellular matrix." J Cell Biol. 1993 Feb;120(3):577-85. Review.
- Kalra, S; Utz, JP; Ryu, JH; Mayo Clinic Interstitial Lung Disease Group; "Interferon gamma-1b therapy for advanced idiopathic pulmonary fibrosis." Mayo Clin Proc. 2003 Sep; 78(9):1082-7
- Kawamoto, M. et al. "Selective migration of alpha-smooth muscle actin-positive myofibroblasts toward fibronectin in the Boyden's blindwell chamber." Clin.Sci.(Lond) 1997.Oct.;93.(4):355.-62.Lond 1997 Oct;93(4):355-62 (1997).
- Kernochan, L. E.; Tran, B.N.; Tangkijvanich, P.; Melton, A. C.; Tam, S. P.; Yee, H.F. Jr. "Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast concentration and migration". Gut 50, 65-70, 2002

- Kiefer, J. et al. "Application of carbon dioxide and erbium:yttrium-aluminum-garnet lasers in inner ear surgery: an experimental study." Otol.Neurotol. 2004.May.;25.(3):400.-9.3:400-9.
- King, TE et al. "Analyses of efficacy end points in a controlled trial of interferon-gamma 1b for idiopathic pulmonary fibrosis." Chest. 2005 Jan; 127(1):171-7
- Kipshidze, N; Moussa, I; Nikolaychik,V; Chekanov,V; Khanna, A; Colombo, A; Leon, MB; Moses, J; "Influence of Class I interferons on performance of vascular cells on stent material in vitro." Cardiovasc Radiat Med. 2002 Apr-Jun;3(2):82-90
- Kirkegaard, T. et al. "Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease." Gut 2004.May.;53.(5):701.-9.5:701-9.
- Klein, I.; Reif, S.; Farbstein, H.; Halak, A.; Gilat, T. "Preillness, non dietary factors and habits in inflammatory bowel disease". Ital. J. Gastroenterol. Hepatol. 30, 247-251, 1998
- Kohyama, T. et al. "Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis." Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 2001.Nov.;281.(5):L1257.-63.5:L1257-63.
- Komarcevic, A; "The modern approach to wound treatment" Med Pregl. 2000 Jul-Aug;53(7-8):363-8
- Kondo, H.; Matsuda, R.; Yonezawa, Y. "Autonomous migration of human fetal skin fibroblasts into a denuded area in a cell monolayer is mediated by basic fibroblast growth factor and collagen." In Vitro Cell Dev.Biol.Anim 1993.Dec.;29A.(12.):929.-35.12:929-35.

- Kondo, H.; Matsuda, R.; Yonezawa, Y. "Platelet-derived growth factor in combination with collagen promotes the migration of human skin fibroblasts into a denuded area of a cell monolayer." Exp.Cell Res. 1992.Sep.;202.(1):45.-51.1:45-51.
- Kondo, H.; Yonezawa, Y.; Ito, H.; "Interferon-beta, an autocrine cytokine, suppresses human fetal skin fibroblast migration into a denuded area in a cell monolayer but is not involved in the age-related decline of cell migration." Mech Ageing Dev. 1996 Jun 25;87(3):141-53
- Korhonen, M.; Ormio, M.; Burgeson, R. E.; Virtanen, I.; Savilahti, E. "Unaltered distribution of laminins, fibronectin and tenascin in celiac intestinal mucosa". J. Histochem. Cytochem., 48, 1011-20; 2000
- Krein, PM; Winston, BW."Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease." Chest. 2002 Dec; 122(6 Suppl):289-293
- Lasky, JA; Brody, AR; "Interstitial fibrosis and growth factors." Environ Health Perspect. 2000 Aug;108 Suppl 4:751.62
- Lawrance, I. C.; Maxwell,L.; Doe, W. "Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease". Inflamm. Bowel. Dis. 7, 226-236, 2001
- Lawrence, D. A.; Pircher, R.; Kryceve-Martinerie, C.; Jullien, P. "Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form". J. Cell Physiol 121, 184-188, 1984
- Leeb, S. N. et al. "Regulation of migration of human colonic myofibroblasts." Growth Factors 2002.Jun.;20.(2):81.-91.2:81-91.

- Leeb, S. N. et al. "Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts." Am.J.Gastroenterol. 2004.Feb.;99.(2):335.-40.2:335-40.
- Leeb, S. N. et al. "Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase." Gastroenterology 2003.Nov.;125.(5):1341.-54.5:1341-54.
- Lenzi, J. A. et al. "Intestinal fibrovascular nodules caused by *Schistosoma mansoni* infection in *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia: Cricetidae): a model of concomitant fibrosis and angiogenesis." Mem.Inst.Oswaldo Cruz 2002.;97.Suppl 1:117.-27. (2002).
- Libura, J; Bettens, F; Radkowski, A; Tiercy, JM; Piguet, PF; "Risk of chemotherapy-induced pulmonary fibrosis is associated with polymorphic tumor necrosis factor- α 2 gene." Eur Respir. J.2002 May; 19(5):912-8
- Liu YW, Sanders MA, Basson MD. Human Caco-2 intestinal epithelial motility is associated with tyrosine kinase and cytoskeletal focal adhesion kinase signals. J Surg Res. 1998 Jul 1;77(2):112-8.
- Longo, W. E. et al. "Outcome of ileorectal anastomosis for Crohn's colitis." Dis.Colon Rectum 1992.Nov.;35.(11):1066.-71.11:1066-71.
- Lorenz, D. et al. "[Crohn disease: resection therapy over the course of two decades]." Zentralbl.Chir 1993.;118.(3):127.-33. discussion.
- Lorenz, R.; Olbert, P.; Born, P. "Factor XIII in chronic inflammatory bowel diseases". Semin. Thromb. Hemost. 22, 451-455, 1996

- Maheshwari, G. et al. "Biophysical integration of effects of epidermal growth factor and fibronectin on fibroblast migration." Biophys.J. 1999.May.;76.(5):2814.-23.5:2814-23.
- Maier, JA; Morelli, D; Lazzerini, D; Menard, S; Colnaghi, MI; Balsari, A; "Inhibition of fibronectin-activated migration of microvascular endothelial cells by interleukin-1alpha, tumour necrosis factor alpha and interferon gamma." Cytokine. 1999 Feb; 11(2):134-9
- Manabe, R.; Ohe N.; Maeda, T.; Fukuda, T.; Sekiguchi, K. "Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by alternatively spliced ED-A segment." J Cell Biol 1997 Oct 6;139(1):295-307
- Martens, M. F. et al. "Collagen synthetic capacity throughout the uninjured and anastomosed intestinal wall." Am.J.Surg. 1992.Oct.;164.(4):354.-60.4:354-60.
- McGarity, W. C.; Mallory, C.; Walker, J. "Perineal wound healing after abdominoperineal resection." Am.Surg. 1976.Mar.;42.(3):206.-11.3:206-11.
- Mchedlidze, M. I. et al. "Impact of high-energy laser irradiation on pulmonic fibroblast in human embryo." Tsitologia 2002.;44.(9.):852.-6.9:852-6.
- McKaig, B. C. et al. "Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3." Am.J.Physiol 1999.May.;276.(5 Pt.1):G1087.-93.5 Pt 1:G1087-93.
- McKaig, B. C. et al. "Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease." Am.J.Pathol. 2003.Apr;162.(4):1355.-60.4:1355-60.

- McLeod, R.; Cohen, Z.; Langer, B.; Taylor, B. "Primary perineal wound closure following excision of the rectum". Can. J. Surg. 26,122-124, 1983
- McLeod, R. "Surgery for inflammatory bowel diseases." Dig.Dis. 2003.;21(2):168.-79.2:168-79.
- Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, Zhu J, Zhao YZ, Wang Z, Chen F, Lee KY, Fu SB. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. Br J Cancer. 2009 Jul 21;101(2):327-34. Epub 2009 Jun 30.
- Mensing, H. et al. "A study on fibroblast chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants." Eur.J.Cell Biol. 1983.Jan.;29.(2):268.-73.2:268-73.
- Miller, R. J. "Treatment of the contaminated implant surface using the Er,Cr:YSGG laser." Implant.Dent. 2004.Jun.;13(2):165.-70.2:165-70.
- Monteleone, G., MacDonald, T. T. "Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease". Ann. Med. 32, 552-560, 2000
- Mordon, S. et al. "In vivo experimental evaluation of skin remodeling by using an Er:Glass laser with contact cooling." Lasers Surg.Med. 2000.;27.(1):1-9.1:1-9.
- Murata, Y.; Ishiguro,Y.; Itoh, J.; Munakata, A.; Yoshida, Y. " The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis". J. Gastroenterol. 30 Suppl 8, 56-60, 1995
- Naito M, Hayashi T, Funaki C, Kuzuya M, Asai K, Yamada K, Kuzuya F. Vitronectin-induced haptotaxis of vascular smooth muscle cells in vitro. Exp Cell Res. 1991 May;194(1):154-6.

- Nathan, SD; Barnett, SD; Moran, B; Helman, DL; Nicholson, K; Ahmad, S; Shorr, AF; "Interferon gamma-1b as therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. An inpatient analysis." Respiration. 2004 Jan-Feb; 71(1):77-82
- Nelson PR, Yamamura S, Kent KC. Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration. J Vasc Surg. 1996 Jul;24(1):25-32; discussion 32-3.
- Neurath, M. F.; Schurmann, G. "[Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]." Chirurg 2000.Jan.;71.(1):30.-40.1:30-40.
- Nocini, P. F. et al. "Treatment of scars with Er:YAG laser in patients with cleft lip: a preliminary report." Cleft Palate Craniofac.J. 2003.Sep.;40.(5):518.-22.5:518-22.
- Oakley, J. R.; Fazio, V. W.; Jagelman, D.G.; Lavery, I. C.; Weakley, F. L.; Easley, K. "Management of the perineal wound after rectal excision for ulcerative colitis". Dis. Colon Rectum 28, 885.888, 1985
- Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R. H.; Achkar, J. P.; Brant, S. R.; Bayless, T. ; Kirschner, B. S.; Hanauer, S. B.; Nunez, G.; Cho, J. H. "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease". Nature 411, 603-606, 2001
- Okuno, T. et al. "Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts." Scand.J.Gastroenterol. 2002.Mar.;37.(3):317.-24.3:317-24.
- Ortiz, LA. et al. "Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice." Exp Lung Res. 1998 Nov-Dez;24(6):721-43

- Pallikaris, I. G.; Kozobolis, V.; Christodoulakis, E. "Erbium:YAG laser deep sclerectomy: an alternative approach to glaucoma surgery." Ophthalmic Surg.Lasers Imaging 2003.Sep.-Oct.;34.(5):375.-80.5:375-80.
- Pan, LH; Ohtani, H; Yamauchi, K; Nagura, H; "Co-expression of TNF alpha and IL-1 beta in human acute pulmonary fibrotic diseases: an immunohistochemical analysis." Pathol Int. 1996 Feb;46(2):91-9
- Pantelidis, P; Fanning, GC; Wells, AU; Welsh, KI; du Bois, RM; "Analysis of tumor necrosis factor-alpha,lymphotoxin-alpha, tumor necrosis factor rezeptor II and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med. 2001 May; 163(6):1432-6
- Pantelidis, P; McGrath, DS; Southcott, AM; Black, CM; du Bois, RM; "Tumor necrosis factor-alpha production in fibrosing alveolitis is macrophage subset spezific." Respir. Res. 2001; 2(6):365-72
- Pardo, A; Selman, M. "Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis." Front Biosci. 2002 Aug 01;7:d1743-61
- Pearson, I. C.; Harland, C. "Epidermal naevi treated with pulsed erbium:YAG laser." Clin.Exp.Dermatol. 2004.Sep.;29.(5):494.-6.5:494-6.
- Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EA, Holzwarth K, Oreshkova T, Wang H, Kess D, Walzog B, Sulyok S, Sunderkötter C, Friedrich W, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K. Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. EMBO J. 2005 Oct 5;24(19):3400-10. Epub 2005 Sep 8.

- Perin, F. M. et al. "Evaluation of the antimicrobial effect of Er:YAG laser irradiation versus 1% sodium hypochlorite irrigation for root canal disinfection." Aust.Endod.J. 2004.Apr;30.(1):20.-2.1:20-2.
- Pfeffer, L. M.; Wang, E.; Tamm, I. "Interferon effects on microfilament organization, cellular fibronectin distribution and cell motility in human fibroblasts". J. Cell Biol. 85, 9-17, 1980
- Piazuelo, E. et al. "Platelet-derived growth factor and epidermal growth factor play a major role in human colonic fibroblast repair activities." Eur.Surg.Res. 2000.;32.(3):191.-6.3:191-6.
- Pichney, L. S.; Fantry, G.; Graham, S. "Gastrocolic and duodenocolic fistulas in Crohn's disease." J.Clin.Gastroenterol. 1992.Oct.;15.(3):205.-11.3:205-11.
- Pontz BF, Albini A, Mensing H, Cantz M, Müller PK. Pattern of collagen synthesis and chemotactic response of fibroblasts derived from mucopolysaccharidosis patients. Exp Cell Res. 1984 Dec;155(2):457-66.
- Postlethwaite, A. E.; Keski-Oja, J.; Moses, H. L.; Kang, A. H. " Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta". J. Exp. Med. 165, 251-256, 1987
- Postlethwaite, A. E.; Seyer, J. M. "Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant TNF-alpha and a synthetic TNF-alpha 31-68 peptide". J. Exp. Med. 172, 1749-1756, 1990
- Prasse, A; Muller, KM; Kurz, C; Hamm, H; Virchow, JC Jr.; "Does interferon-gamma improve pulmonary function in idiopathic pulmonary fibrosis?" Eur Respir. J.2003 Dec;22(6):906-11

- Pucilowska, J. B.; Williams, K. L.; Lund, P. K. "Fibrogenesis, Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models". Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279, G653-G659, 2000
- Pujuguet, P.; Hammann, A.; Moutet, M.; Samuel, J. L.; Martin, F.; Martin, M. "Expression of Fibronectin ED-A+ and ED-B+ isoforms by human and experimental colorectal cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts". Am J. Pathol. 148, 579-92, 1996
- Radner, G. et al. "Tissue damage at anterior capsule edges after continuous curvilinear capsulorhexis, high-frequency capsulotomy, and erbium:YAG laser capsulotomy." J.Cataract Refract.Surg. 2004.Jan.;30.(1):67.-73.1:67-73.
- Raghow, R. et al. "Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts." J.Clin.Invest 1987.Apr;79.(4):1285.-8.4:1285-8.
- Raghu, G. et al. "A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med. 2004 Jan 8; 350(2):125-33
- Reinshagen, M. "Praxis der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen-Eine Fibel für den Hausarzt". 2001.
- Rey SM, Povazay B, Hofer B, Unterhuber A, Hermann B, Harwood A, Drexler W. Three- and four-dimensional visualization of cell migration using optical coherence tomography. J Biophotonics. 2009 Jul;2(6-7):370-9.
- Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Schölmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. Gut. 2007 Jan;56(1):130-9. Review.

- Rogler, G.; Gelbmann, C. M.; Vogl, D.; Brunner, M.; Schölmerich, J.; Falk, W.; Andus, T.; Brand, K. "Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures". Scand. J. Gastroenterol. 36, 389-398, 2001
- Rossa, C. J. et al. "Root instrumentation with an erbium:yttrium-aluminum-garnet laser: effect on the morphology of fibroblasts." Quintessence.Int. 2002.Jul.-Aug.;33.(7.):496.-502.7:496-502.
- Russel, M. G. et al. "Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors." Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. 1998.Mar.;10(3):243.-9.3:243-9.
- Russel, M. G. et al. "Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group." Inflamm.Bowel.Dis. 1998.Aug.;4(3):182.-6.3:182-6.
- Saganuma, H; Sato, A; Tamura, R; Chida, K; "Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions." Thorax 1995 Sep;50(9):984-9
- Salas, A. et al. "Subepithelial myofibroblasts and tenascin expression in microscopic colitis." Histopathology 2003.Jul.;43.(1):48.-54.1:48-54.
- Sandborn, W. J.; Yednock, T. "Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin." Am.J.Gastroenterol. 2003.Nov.;98.(11):2372.-82.11:2372-82.
- Sandborn, W.J. "How future tumor necrosis factor antagonists and other compounds will meet the remaining challenges in Crohn's disease." Rev Gastroenterol Disord. 2004;4 Suppl 3:S25-33

- Sands, B. E. et al. "Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study." Clin.Gastroenterol.Hepatol. 2004.Oct.;2(10):912-20.10:912-20.
- Santimaria, M.; Moscatelli, G.; Viale, GL.; Giovannoni, L; Neri, G.; Viti, F.; Leprini, A.; Borsi, L.; Castellani, P.; Zardi, L.; Neri, D.; Riva, P. "Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer." Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2) 571-9
- Sasaki, M; Kashima, M; Ito, T; Watanebe, A; Izumiyama, N; Sano, M; Kagaya, M; Shioya, T; Miura, M; " Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha." Mediators Inflamm. 2000;9(3-4):155-60
- Sato, E. et al. "Reactive oxygen and nitrogen metabolites modulate fibronectin-induced fibroblast migration in vitro." Free Radic.Biol.Med. 2001.Jan.1;30.(1):22-9.1:22-9.
- Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterol Clin North Am. 1995 Sep;24(3):475-507
- Scala, E; Pallotta, S; Frezzolini, A; Abendi, D; Barbieri, C; Sampogna, F; De Pitta, O; Puddu, P; Paganelli, R; Russo, G; "Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement." Clin. Exp. Immunol. 2004 Dec; 138(3):540-6
- Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. Prog Biophys Mol Biol. 1999;71(3-4):435-78. Review

Selman, M. and Pardo, A. "Idiopathic pulmonary fibrosis: misunderstandings between epithelial cells and fibroblasts?" Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2004 Oct. 21(3):165-72

Selman, M; Thannickal, VJ; Pardo, A; Zisman, DA; Martinez, FJ; Lynch, JP; "Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches." Drugs 2004;64(4):405-30

Schirren, C. G.; Scharffetter, K.; Hein, R.; Braun, F. O.; Krieg, T. "Tumor necrosis factor alpha induces invasiveness of human skin fibroblasts in vitro". J. Invest Dermatol. 94, 706-710, 1990

Schoelmerich, J. "Medizinische Therapie in Klinik und Praxis", Springer Verlag, 2004

Schor, S. L. et al. "Substratum-dependent stimulation of fibroblast migration by the gelatin-binding domain of fibronectin." J.Cell Sci. 1996.Oct.;109.(Pt.10):2581.-90.Pt 10:2581-90

Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. J Cell Sci. 1999 Aug;112 (Pt 16):2677-91.

Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. "Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts." Nat Cell Biol. 2000 May;2(5):249-56.PMID: 10806474

Sime, P.J. et al. "Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta 1 and myofibroblasts." Am J Pathol. 1998 Sep;153(3):825-32

- Sime, P.J. ; O'Reilly, KM; "Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment." Clin Immunol.2001 Jun; 99(3):308-19
- Spoelstra, FM; Postma, DS; Hovenga, H; Noordhoek, JA; Kauffman, HF; "Interferon-gamma and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts." Eur Respir. J. 1999 Oct;14(4):759-66
- Schreiber, S. "Pathophysiologie der chronisch-intestinalen Entzündung: Gestörte Homöostase von Entzündungsmediatoren?". Aspekte im Gespräch - Extracta aus Wissenschaft und Klinik 10, Biotest Pharma GmbH, S. 9-17, 1998
- Schwab, B. et al. "[Bone ablation using ultrashort laser pulses. A new technique for middle ear surgery]." Laryngorhinootologie 2004.Apr;83.(4):219.-25.4:219-25.
- Schwarz, F. et al. "Effects of an Er:YAG laser and the Vector ultrasonic system on the biocompatibility of titanium implants in cultures of human osteoblast-like cells." Clin.Oral Implants.Res. 2003.Dec.;14(6.):784.-92.6:784-92.
- Strieter, RM; Starko, KM; Enelow, RI; Noth, I; Valentine, VG; Idiopathic Pulmonary Fibrosis Biomarkers Study Group; "Effects of interferon-gamma 1b on biomarker expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med. 2004 Jul 15; 170(2):133-40
- Sturm, A. et al. "Dual function of the extracellular matrix: stimulatory for cell cycle progression of naive T cells and antiapoptotic for tissue-derived memory T cells." J.Immunol. 2004.Sep.15.;173.(6.):3889.-900.6:3889-900.
- Sturm, A. et al. "Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid." Gastroenterology 1999.Aug.;117.(2):368.-77.2:368-77.

- Sturm, A.; Schulte, C.; Schatton, R.; Becker, A.; Cario, E.; Goebell, H.; Dignass, A. "Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor plasma levels in patients with inflammatory bowel disease". Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 12, 445-450, 2000
- Suganuma H, Sato A, Tamura R, Chida K. Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. Thorax. 1995 Sep;50(9):984-9.
- Sviridov, A. P. et al. "Attenuated total reflection Fourier transform infrared and polarization spectroscopy of in vivo human skin ablated, layer by layer, by erbium:YAG laser." J.Biomed.Opt. 2004.Jul.-Aug.;9.(4):820.-7.4:820-7.
- Szekanecz, Z; Shah, MR; Harlow, LA; Pearce, WH; Koch, AE; "Interleukin-8 and tumor nekrosis factor-alpha are involved in human aortic endothelial cell migration. The possible role of these cytokines in human aortic aneurysmal blood vessel growth." Pathobiology. 1994;62(3):134-9
- Takamori, K. "A histopathological and immunohistochemical study of dental pulp and pulpal nerve fibers in rats after the cavity preparation using Er:YAG laser." J.Endod. 2000.Feb.;26.(2):95.-9.2:95-9..
- Tamura, R; Sato, A; Chida, K; Suganuma, H; "Fibroblasts as target and effector cells in Japanese patients with sarcoidosis." Lung 1998;176(2):75-87
- Thampatty BP, Wang JH. A new approach to study fibroblast migration. Cell Motil Cytoskeleton. 2007 Jan;64(1):1-5.

- Thrall, RS; Vogel, SN; Evans, R; Shutz, LD; "Role of tumor necrosis factor-alpha in the spontaneous development of pulmonary fibrosis in viable motheaten mutant mice." Am J Patjol. 1997 Nov; 151(5):1303-10
- Tompkins, R. G., Warshaw, A. L. "Improved management of the perineal wound after proctectomy". Ann.Surg. 202, 760-765, 1985
- van As, G. "Erbium lasers in dentistry." Dent.Clin.North Am. 2004.Oct.;48.(4):1017.-59.,
- Vancheri, C. et al. "Different expression of TNF-alpha receptors and prostaglandin E(2) production in normal and fibrotic lung fibroblasts: potential implications for the evolution of the inflammatory process." Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 May; 22(5):628-34
- Van Gossum, A. et al. "Epidemiology of inflammatory bowel disease in Brussels' area (1992-1993)." Acta Gastroenterol.Belg. 1996.Jan.-Mar.;59.(1):7.-9.1:7-9.
- Vaughan, M. B. et al. "A reproducible laser-wounded skin equivalent model to study the effects of aging in vitro." Rejuvenation.Res. 2004.Summer.;7.(2):99.-110.2:99-110.
- Wahl, S. M. et al. "Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1987.Aug.;84.(16.):5788.-92.16:5788-92.
- Waits, J. O.; Dozois, R.; Kelly, K. "Primary closure and continuous irrigation of the perineal wound after proctectomy." Mayo Clin.Proc. 1982.Mar.;57.(3):185.-8.3:185-8.
- Walia, B. et al. "Polarized fibronectin secretion induced by adenosine regulates bacterial-epithelial interaction in human intestinal epithelial cells." Biochem.J. 2004.Sep.1;382.(Pt.2):589.-96.Pt 2:589-96.

- Warshamana, GS; Corti, M; Brody, AR; "TNF-alpha, PDGF and TGF-beta1 expression by primary mouse bronchiolar-alveolar epithelial and mesenchymal cells: tnf-alpha induces TGF-beta1." Exp Mol Pathol. 2001 Aug; 71(1):13-33
- White, ES; Atrasz, RG; Dickie, EG; Aronoff, EM; Stambolic, V; Mak, TW; Moore, DB; Peters-Golden, M. "Prostaglandin E2 inhibits fibroblast migration by E-prostanoid 2 Receptor-mediated increase in PTEN Activity." Am J. Resp. Cell. Mol. Biol. 2005 Feb. 32(2):135-141
- Whiting, C. V. et al. "Abnormal mucosal extracellular matrix deposition is associated with increased TGF-beta receptor-expressing mesenchymal cells in a mouse model of colitis." J.Histochem.Cytochem. 2003.Sep.;51.(9.):1177.-89.9:1177-89.
- Xu, J.; Clark, R. "Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins." J.Cell Biol. 1996.Jan.;132.(1-2):239.-49.1-2:239-49.
- Yamanaka, O; Saika, S; Okada, Y; Ooshima, A; Ohnishi, Y; "Effects of interferon-gamma on human subconjunctival fibroblasts in the presence of TGFbeta1: reversal of TGFbeta-stimulated collagen production." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2003 Feb;241(2):116-24
- Zeile, G.; Baake, M.; Henrici, G. "Kompendium der praktischen Hämtologie", Darmstadt:GIT Verlag Ernst Giebler, 1983
- Zimmermann, E. M. et al. "Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 5 in Crohn's disease." Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 2001.May.;280.(5):G1022.-9.5:G1022-9.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich für die Ermöglichung dieser Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler und Frau Dr. rer. nat. Sandra Leeb für deren hervorragende und stets engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Landthaler danke ich für die Bereitstellung der Lasertechnik durch die Klinik für Dermatologie der Universität Regensburg.

Danken möchte ich auch Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Hausmann, Frau Sylvia Kellermeier und Frau Dr. rer. nat. Julia Brenmoehl, die mir bei allen kleinen und großen Problemen während dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Daniela Vogl und Frau Manuela Gunckel, die mich als technische Assistentinnen jederzeit mit Rat und Tat unterstützten.

Bei den Kollegen aus der Endoskopie und Chirurgie möchte ich mich für die Bereitstellung von Biopsien und Darmgewebe von Morbus Crohn-Patienten bedanken.

Besonderen Dank schulde ich meiner Familie die mir sowohl während des Studiums, als auch bei der Promotion zu jeder Zeit den Rücken gestärkt hat.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Dr. Johannes Karl-Heinz Meier
Wohnort:	Wassergasse 2 93059 Regensburg
Geburtstag und –ort:	08.12.1978 in Amberg
Familienstand:	verheiratet (mit Claudia Meier-Gesell), 1 Sohn
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

1985-1988	Grundschule
1989-1998	Gymnasium
26.06.1998	Abitur

Berufsausbildung

1998-2000	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
12.09.2000	Physikum (Humanmedizin)
2000-2004	Klinisches Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Regensburg
28.08.2001	1. Staatsexamen Humanmedizin
15.09.2003	2. Staatsexamen Humanmedizin
2003	Beginn des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum Regensburg
05.10.2004	3. Staatsexamen Humanmedizin
22.10.2004	Approbation als Arzt
2004	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
Seit Juli 2007	Assistenzarzt in der Abteilung für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie an der Uniklinik Regensburg
07.05.2008	Staatsexamens Zahnmedizin
16.05.2008	Approbation als Zahnarzt

Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen:

März 2001	Rehabilitative und Präventive Sportmedizin an der TU München
März-April 2002	Unfallchirurgie/Barmherzige Brüder Regensburg
September-Oktober 2002	Pathologie/Universitätsklinikum Regensburg
Februar-März 2003	Ophthalmologie/ Universitätsklinikum Regensburg
März 2003	Innere Medizin/ Universitätsklinikum Regensburg

Promotion:

Prof. Dr. Dr. G. Rogler
in der Klinik für Innere Medizin I
Thema: „Das autokrine fibronectin induzierte Migrationsverhalten von humanen intestinalen Myofibroblasten bei Patienten mit Morbus Crohn“
Prädikat: „summa cum laude“

Publikationen:

Posterbeiträge auf der AGA 2004 und 2005 in Chicago
Fallbericht über künstlichen Kiefergelenkersatz (HNO, May 2007))
Posterbeitrag zum Kieferchirurgischen Kongress 2006 in Wiesbaden

Zusatzqualifikationen:

SS 2001-WS 2001/02	Sportmedizin 1 und 2
SS 2002	Praktische Übungen zur Ultraschalldiagnostik in der Chirurgie
WS 2002/03	Seminar der Behandlungsprinzipien in der Traumatologie des Kindesalters
SS 2003	Praktische Übungen zur Schmerztherapie

Sonstiges:

Fremdsprachen: Englisch, Latein
Hobbys: Volleyball (Trainer und Spieler), Tennis, Klavier und Chorgesang
USA-Aufenthalt im Rahmen des German American Partnership Programme 1996